

Université de Montréal

**Effet d'un extrait plaquettaire sur l'expansion *ex vivo* de  
progéniteurs hématopoïétiques**

Par

Marie-Pier Giard

Département de médecine

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de

**Maitrise ès sciences (M.Sc.)**

Août, 2003

©Marie-Pier Giard, 2003

W

4

U58

2004

V.066

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Effet d'un extrait plaquettaire sur l'expansion ex vivo de  
progéniteurs hématopoïétiques**

présenté par :

Marie-Pier Giard

a été évalué par un jury composé les personnes suivantes :

Dr. Éric Milot

Président du jury

Dr. Denis Claude Roy

Directeur de recherche

Dr. Trang Hoang

Membre du jury



## SOMMAIRE

La thrombocytopénie qui survient suite à une greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) est associée à plusieurs complications hémorragiques et infectieuses graves, ces dernières étant liées aux transfusions sanguines. Une diminution de l'intensité ou de la durée de la thrombocytopénie représenterait donc un avantage thérapeutique considérable. Au cours de notre étude, nous avons évalué la capacité d'un extrait de plaquettes matures (PDFM) à promouvoir l'expansion *ex vivo* des cellules totales ainsi que des progéniteurs mégakaryocytaires, myéloïdes en utilisant des essais clonogéniques *in vitro*. Une exposition des cellules de moelle osseuse de souris C57BL/6J à 5% de PDFM dans du milieu sans sérum pendant 2 jours a augmenté à 260 la fréquence en progéniteurs mégakaryocytaires ( $p=0.018$ ). Afin d'améliorer l'effet du PDFM, le stem cell factor (SCF) et la thrompoïétine (TPO) ont été combinées au PDFM. In vitro, le SCF semble agir en synergie avec le PDFM en augmentant de 2.5 à 4.5 X les progéniteurs myéloïdes en culture. Des expériences *in vitro* ont également été effectuées sur les cellules CD34+ d'échantillons de sang de cordon ombilical. Le PDFM amène une prolongation de la survie des progéniteurs mégakaryocytaires durant un minimum de 6 jours. Ces résultats nous ont amené à développer un modèle murin de greffe de cellules souches afin de mesurer l'effet du PDFM sur la reconstitution hématologique. Les souris transplantées avec des cellules incubées dans un milieu contenant 5% de PDFM ont vu leur taux de plaquettes augmenter plus rapidement que les souris greffées avec de la moelle fraîche et ce de manière significative ( $p=0.0023$ ). Ces résultats suggèrent donc que le PDFM est un composé prometteur ayant l'habileté d'induire l'expansion *ex vivo* de certains progéniteurs hématopoïétiques et pourrait avoir un impact clinique sur la reconstitution hématologique.

## ABSTRACT

Patients that undergo bone marrow transplantation following myeloablative treatment usually develop severe and sometimes prolonged thrombo- and neutropenia. One possible and currently intensely researched method to decrease the time to engraftment is *ex vivo* expansion of hematopoietic clonogenic progenitors using different cytokines or their combinations. In this study we tested the ability of PDFM, a mature porcine platelets extract, to support the *in vitro* expansion of hematopoietic progenitors. The culture of murine bone marrow cells in the presence of PDFM in serum-free medium for 2 days resulted in a significant 260% increase of megakaryocytic progenitors ( $p=0.018$ ). In order to enhance the effect of PDFM, we combined this product with stem cell factor (SCF) and thrombopoietin (TPO). *In vitro*, SCF significantly increased PDFM induced expansion of myeloid progenitors from 250% to 450%. In addition, PDFM prolonged the survival of megakaryocytic progenitors from umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> cells. In a mouse bone marrow transplantation model, the platelet level of irradiated mice transplanted with PDFM treated cells increased earlier than in mice that received fresh bone marrow ( $p=0.0023$ ). These results suggest that PDFM has the ability to induce *ex vivo* expansion of myeloid and particularly megakaryocytic hematopoietic progenitors and could have an impact on hematologic reconstitution.

## TABLE DES MATIÈRES

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCTION .....</b>                                       | <b>1</b>  |
| <b>1. LA GREFFE DE CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES .....</b>  | <b>2</b>  |
| 1.1 LA GCSH ALLOGÉNIQUE .....                                   | 2         |
| 1.2 LA GCSH AUTOLOGUE.....                                      | 3         |
| <b>2. LES SOURCES DE CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES.....</b> | <b>5</b>  |
| 2.1 LA MOELLE OSSEUSE (MO) .....                                | 5         |
| 2.2 LES CELLULES DU SANG.....                                   | 5         |
| 2.3 LE SANG DE CORDON OMBILICAL (SC) .....                      | 6         |
| <b>3. L'HÉMATOPOÏÈSE .....</b>                                  | <b>7</b>  |
| 3.1 LES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES .....                 | 7         |
| 3.1.1 Les cellules CD34+ .....                                  | 8         |
| 3.1.2 Autres marqueurs de CSH.....                              | 9         |
| 3.2 LES PROGÉNITEURS HÉMATOPOÏÉTIQUES.....                      | 9         |
| 3.2.1 Progéniteurs lymphoïdes .....                             | 10        |
| 3.2.2 Progéniteurs myéloïdes .....                              | 10        |
| <b>4. LA MÉGAKARYOCYTOPOÏÈSE .....</b>                          | <b>11</b> |
| 4.1 LA THROMBOCYTOPÉNIE .....                                   | 12        |
| 4.2 LES TRANSFUSIONS PLAQUETTAIRES.....                         | 12        |
| <b>5. LES CYTOKINES .....</b>                                   | <b>14</b> |
| 5.1 IL-6 .....  | 14        |
| 5.2 IL-11 .....   | 16        |
| 5.3 THROMBOPOÏÉTINE (TPO) .....                                 | 17        |
| 5.4 STEM CELL FACTOR (SCF) .....                                | 19        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6. L'EXPANSION <i>EX VIVO</i> DE CELLULES SOUCHES<br/>HÉMATOPOÏÉTIQUES .....</b>    | <b>21</b> |
| 6.1 EXPANSION <i>EX VIVO</i> DES PROGÉNITEURS MÉGAKARYOCYTAIRES.....                   | 22        |
| 6.2 SOURCES DE CELLULES POUR L'EXPANSION DES MK.....                                   | 23        |
| 6.3 COMBINAISON DE CYTOKINES POUR L'EXPANSION DES MK.....                              | 23        |
| 6.4 ÉTUDE CLINIQUES.....   | 25        |
| <b>7. EXPANSION <i>EX VIVO</i> AVEC LE PDFM.....</b>                                   | <b>28</b> |
| <b>8. DESCRIPTION DU PROJET DE MAÎTRISE .....</b>                                      | <b>29</b> |
| 8.1 PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE .....  | 29        |
| 8.1.1 La culture liquide de progéniteurs hématopoïétiques .....                        | 29        |
| 8.1.2 L'évaluation des progéniteurs myéloïdes murins et humains .....                  | 30        |
| 8.1.3 L'évaluation des progéniteurs mégakaryocytaires murins et humains.....           | 30        |
| 8.1.4 La greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH).....                       | 30        |
| 8.2 OBJECTIF PRINCIPAUX DE CE PROJET.....  | 31        |
| <b>ARTICLE.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>DISCUSSION DES RÉSULTATS .....</b>  | <b>63</b> |
| <b>9. TITRE .....</b>  | <b>64</b> |
| 9.1 PERTINENCE DU PROJET .....   | 64        |
| 9.2 BUT DU PROJET ET RÉSULTATS OBTENUS .....   | 65        |
| <b>10. EXPANSION <i>EX VIVO</i> DES PROGÉNITEURS HÉMATOPOÏÉTIQUES<br/>MURINS .....</b> | <b>67</b> |
| 10.1 PDFM : TEST D'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE .....                                       | 68        |
| 10.2 EFFET DU PDFM SUR LES PROGÉNITEURS MURINS.....                                    | 68        |
| 10.2.1 Effet préférentiel du PDFM sur les progéniteurs mégakaryocytaires .....         | 68        |
| 10.2.2 Quel constituant des plaquettes pourrait être responsable de cet effet? .....   | 69        |



|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| <b>10.3</b> | <b>EFFET DE L'AJOUT DE SÉRUM DANS LA CULTURE LIQUIDE.....</b>  | <b>70</b> |
| 10.3.1      | Augmentation des progéniteurs myéloïdes en présence de sérum .....   | 70        |
| 10.3.2      | Diminution de l'expansion des progéniteurs MK en présence de SVF<br>⇒Rôle du TGF- $\beta$ dans ce phénomène .....                | 70        |
| <b>10.4</b> | <b>LE TGF-<math>\beta</math> POURRAIT IL ÊTRE RESPONSABLE DE L'EFFICACITÉ MODÉRÉE DU<br/>PDFM SUR LES PROGÉNITEURS MK? .....</b> | <b>71</b> |
| <b>10.5</b> | <b>EFFET DE LA COMBINAISON DU PDFM AVEC DIFFÉRENTES CYTOKINES.....</b>   | <b>72</b> |
| <b>11.</b>  | <b>EXPANSION <i>EX VIVO</i> DES PROGÉNITEURS DE SANG DE CORDON<br/>OMBILICAL .....</b>   | <b>74</b> |
| <b>11.1</b> | <b>LE PDFM MAINTIEN LES PROGÉNITEURS MK DANS UNE CULTURE À COURT<br/>TERME DE CELLULES CD34+ .....</b>                           | <b>74</b> |
| <b>11.2</b> | <b>EFFET DE MAINTIEN DES PROGÉNITEURS MYÉLOÏDES ET ÉRYTHROÏDES .....</b>   | <b>75</b> |
| <b>11.3</b> | <b>DIMINUTION DES PROGÉNITEURS MK LORS DE LA COMBINAISON DU PDFM<br/>ET DE LA TPO .....</b>                                      | <b>75</b> |
|             | ⇒INFLUENCE DU TGF- $\beta$ .....   | 75        |
| <b>12.</b>  | <b>MODÈLE MURIN DE GCSH.....</b>   | <b>77</b> |
| <b>12.1</b> | <b>MISE AU POINT DU MODÈLE DE GCSH .....</b>   | <b>77</b> |
| <b>12.2</b> | <b>REPRISE PLAQUETTAIRE PRÉCOCE CHEZ LES SOURIS DONT LA MO A ÉTÉ<br/>TRAITÉE AVEC LE PDFM .....</b>                              | <b>77</b> |
| <b>12.3</b> | <b>LE PDFM SEMBLE PRÉSERVER LES PROGÉNITEURS POUR LA<br/>RECONSTITUTION À LONG TERME.....</b>                                    | <b>80</b> |
| <b>13.</b>  | <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>   | <b>82</b> |

## **LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS**

**AchE** : Acétylcholinestérase

**BSA** : Albumine Bovine (“Bovine Serum Albumin”)

**CFC** : “Colony Forming Cell”

**CFU-G** : “Colony Forming Unit-Granulocyte”

**CFU-GEMM** : “Colony Forming Unit-Granulocyte-Erythrocyte-Macrophage-Megakaryocyte”

**CFU-GM** : “Colony Forming Unit-Granulocyte-Macrophage”

**CFU-M** : “Colony Forming Unit-Macrophage”

**CSH** : Cellule Souche Hématopoïétique

**CSP** : Cellules Souches Périphériques

**EPO** : Érythropoïétine

**G-CSF** : “Granulocyte-Colony Stimulating Factor”

**GCSH** : Greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques

**GM-CSF** : “Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor”

**GMO** : Greffe de Moelle Osseuse

**GVHD** : Maladie du greffon contre l’hôte (“Graft Versus Host Disease”)

**FDA** : “Food and Drug Administration”

**IL-3** : Interleukine-3

**IL-6** : Interleukine-6

**IL-11** : Interleukine-11

**HLA** : “Human Leukocyte Antigen”

**MGDF** : “Megakaryocyte Development and Growth Factor”

**MK** : Mégakaryocyte

**MO** : Moelle Osseuse

**PDFM** : “Platelet Derived Factor Mix”

**PDGF** : “Platelet Derived Growth Factor”

**SCF** : “Stem Cell Factor”

**SC** : Sang de Cordon Ombilical

**SVF** : Sérum de Veau Foetal

**TGF- $\beta$**  : “Transforming Growth Factor- $\beta$ ”

**TPO** :Trombopoïétine

## REMERCIEMENTS

*Je désire remercier le Dr Denis Claude Roy pour m'avoir donné l'opportunité de continuer mes études dans son laboratoire de recherche et pour m'avoir permis de travailler sur un projet aussi motivant. Je le remercie également pour son support et sa confiance au cours des deux dernières années.*

*Je remercie Gorazd Krosl pour son support intellectuel et sa disponibilité ainsi que Nancy Dallaire et Brigitte Léonard pour leur confiance, leur expérience et leur aide inestimable. Je tiens à souligner plus particulièrement l'aide que m'a apporté Radia Sidi-Boumédine, sa présence, sa générosité ainsi que son amitié. Je remercie tous les membres du laboratoire et je tiens à souligner la collaboration de CelMed Biosciences pour l'élaboration de ce projet.*

*En dernier lieu, je tiens à remercier Rémi Dumoulin ainsi que les membres de ma famille pour leur confiance, leur compréhension et leur support au cours de mes études.*

## **INTRODUCTION**

## 1. La greffe de cellules souches hématopoïétiques

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) est une intervention utilisée de plus en plus fréquemment lors du traitement de patients atteints de diverses maladies comportant un risque élevé de mortalité à court terme, ou affectant la qualité de vie de façon sérieuse. Ces maladies peuvent être d'origine hématologique, les principales étant les leucémies et les lymphomes<sup>1</sup>. Cependant, la GCSH peut également servir de traitement pour divers cancers comme le cancer du sein, les neuroblastomes, certains sarcomes et des tumeurs germinales<sup>2</sup> ainsi que pour traiter certains désordres immunologiques tels que la sclérodermie, l'arthrite rhumatoïde sévère et le lupus érythémateux disséminé<sup>3</sup>. La GCSH est une intervention visant à remplacer les cellules de la moelle osseuse (MO) du receveur par des cellules souches hématopoïétiques (CSH) saines. Cette intervention est généralement accompagnée, dans le cas de leucémies et de lymphomes, d'un conditionnement myélo-ablatif visant à éliminer directement les cellules de la maladie et à favoriser la prise du greffon en affaiblissant le système immunitaire du patient. Ce régime de conditionnement consiste en l'administration de fortes doses de chimiothérapie et de radiothérapie induisant une cytoréduction importante des cellules tumorales. Il est suivi de l'infusion de cellules souches immunologiquement compatibles d'un donneur ou encore des propres cellules souches du patient.

### 1.1 *La GCSH allogénique*

La GCSH allogénique est caractérisée par le fait que le donneur et le receveur sont deux individus de la même espèce. Lorsque le donneur et le receveur sont des jumeaux identiques, on parle de greffe syngénique alors que lorsqu'ils sont frères ou sœurs, on parle de greffe génoïdétique. Enfin, il est question d'allogreffe lorsque le donneur et le receveur sont de la même espèce mais présentent un bagage génétique différent. Dans ce dernier cas, il est d'une importance capitale de trouver un donneur dont la compatibilité au niveau du HLA, le système

d'histocompatibilité leucocytaire, soit la plus rapprochée possible de celle du receveur<sup>4</sup>. Bien que ce type de greffe permet d'éliminer totalement le risque de contamination du greffon par des cellules tumorales, ce qui peut être le cas lors de greffes autologues, un des risques majeurs demeure la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) qui peut être observée sous une forme chronique ou aiguë. Elle est liée à l'effet des cellules immunitaires (lymphocytes) contenues dans le greffon contre les organes normaux du patient, notamment la peau, le foie et le tube digestif. Le rejet du greffon est un second risque que peuvent courir les individus recevant une allogreffe. Dans cette situation, les cellules de l'hôte vont reconnaître celles du greffon et, si elles détectent une incompatibilité antigénique, elles vont les détruire. Comme le greffon est éliminé, le patient sera en situation de myéloablation générale qui, en de nombreux cas, peut s'avérer mortelle.

## ***1.2 La GCSH autologue***

La GCSH autologue est caractérisée par le fait que les cellules du greffon proviennent de la personne traitée. En effet, les cellules du patient sont prélevées et congelées avant le traitement myélo-ablatif afin de pouvoir être réinfusées par la suite. Cette intervention est de plus en plus utilisée pour traiter diverses maladies telles le cancer du sein, les leucémies myéloïdes et lymphoblastiques aiguës et chroniques, le myélome multiple, les lymphomes Hodgkiniens, et non-Hodgkiniens, ainsi que certains désordres du système immunitaire comme la sclérodermie, l'arthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux disséminé<sup>5</sup>. Une étude a révélé, en 1997, que 70% des GCSH effectuées en Europe cette année-là étaient de nature autologue<sup>6</sup>. L'avantage majeur de cette procédure est sans contredit la compatibilité entre le greffon et le receveur, éliminant ainsi tout risque de rejet ou encore de GVHD. Cependant, la possibilité de contamination du greffon par des cellules tumorales est un facteur non négligeable lors d'une greffe autologue. De nombreuses études ont donc pour objectif d'élaborer des techniques de purge visant à éliminer, *in vitro*, les cellules tumorales présentes dans le greffon. Des produits tels le mafosfamide and 4-

hydroxyperoxycyclophosphamide, des métabolites actifs du cyclophosphamide, sont des agents pharmacologiques fréquemment utilisés pour la purge des cellules tumorales<sup>7</sup>. Le désavantage de ces composés est d'éliminer non seulement les cellules tumorales mais aussi une partie des cellules saines. D'autres produits, tels l'Amifostine, ont été développés afin de préserver les cellules normales qui sont nécessaire à la reconstitution hématologique du patient<sup>8</sup>. Dans notre laboratoire, nous étudions actuellement des approches de thérapie photodynamique afin d'éliminer les cellules malignes des greffons de CSH<sup>9</sup>. Cette stratégie est relativement spécifique pour les cellules malignes et épargne la grande majorité des cellules progénitrices normales. Malgré la spécificité de ces manipulations cellulaires, un léger délai dans la prise de greffon demeure probable. De plus, une greffe de cellules souches, peu importe qu'il y ait ou non manipulation cellulaire, est associée à une période d'aplasie où le patient requiert des transfusion érythrocytaires et plaquettaires, et durant laquelle la neutropénie sévère le rend à haut risque d'infection. Toute intervention ayant la capacité de réduire la durée des cytopénies après la chimio/radiothérapie devrait avoir un impact clinique significatif.



## 2. Les sources de cellules souches hématopoïétiques

### 2.1 *La moelle osseuse (MO)*

Les cellules hématopoïétiques qui sont retrouvées dans le sang originent de la MO. C'est dans cet organe que s'effectue la régulation de l'hématopoïèse. En effet, la MO contient les CSH et les progéniteurs qui permettent un renouvellement quotidien du contenu sanguin. Depuis de nombreuses années, les greffons médullaires sont utilisés pour les allogreffes ainsi que les autogreffes. Ceci implique une intervention en salle d'opération, avec une anesthésie, et de multiples ponctions au niveau des os du bassin afin de prélever suffisamment de MO pour procéder à la greffe.

### 2.2 *Les cellules du sang*

Les chercheurs ont découvert, il y a une vingtaine d'années, que CSH ne se retrouvaient pas uniquement dans la MO mais aussi dans le sang. Les cellules souches ne s'y retrouvent cependant qu'en faible quantité. Une découverte des plus intéressante démontre que certains facteurs de croissance, lorsqu'administrés à des patients induisent la relâche de progéniteurs hématopoïétiques dans le sang circulant. À l'aide de facteurs de croissance, le nombre de progéniteurs hématopoïétiques circulants peut être augmenté jusqu'à 60 fois<sup>10,11</sup>. Les facteurs de croissance les plus utilisés sont le « granulocyte colony stimulating factor » (G-CSF), aussi connu sous le nom de filgrastim, ainsi que le « granulocyte-macrophage colony stimulating factor » (GM-CSF). Plus récemment, le « stem cell factor » a été combiné au G-CSF et permet une potentialisation de l'effet de mobilisation de CSH. La mobilisation est régulée au niveau du micro-environnement de la MO via la modulation des interactions entre les progéniteurs hématopoïétiques et le stroma médullaire<sup>12</sup>. Les cellules souches retrouvées dans le sang après la mobilisation sont habituellement caractérisées par l'expression, à leur surface, du marqueur phénotypique CD34. Il est à noter que, dans le cas d'autogreffe, le sang mobilisé peut également être contaminé par des cellules

tumorales<sup>13,14</sup>. Les CSH sont recueillies par leucophérèse, une procédure au cours de laquelle les leucocytes circulants sont séparés et conservés alors que les autres éléments du sang, y compris les globules rouges, sont réinfusés au patient. Cette méthode de prélèvement du greffon comporte, pour le donneur, un inconfort moindre que celui subi lors d'une ponction de MO et de plus, les cellules ainsi recueillies amènent une reprise hématologique plus rapide après la greffe.

### **2.3 *Le sang de cordon ombilical (SC)***

Le sang de cordon ombilical (SC) est une riche source de CSH. En effet, il a été démontré que le SC contient un nombre significativement plus élevé de progéniteurs précoces ou engagés si on le compare au sang adulte<sup>15</sup>. Par exemple, on retrouve dans le sang SC un nombre plus élevé de progéniteurs CFU-GM ("colony forming granulocyte-macrophage") et de CFU-GEMM ("colony forming granulocyte-erythrocyte-macrophage-megakaryocyte") ainsi qu'une vitesse de prolifération plus rapide de ces progéniteurs<sup>16,17</sup>. Il a aussi été démontré que l'alloréactivité des lymphocytes T du sang de cordon ombilical est plus faible que celles des lymphocytes T du sang adulte<sup>18</sup>. Ceci pourrait être à l'origine d'une diminution des risques de GVHD lors d'une allogreffe de SC. Le SC offre de nombreux avantages dont la disponibilité, l'absence de risque pour le donneur et le faible taux de maladies infectieuses. Cependant, il est important de noter le facteur limitant principal de l'utilisation du SC. Étant donné la faible quantité de CSH totales dans le SC d'un donneur et que le nombre de cellules dont un receveur a besoin est évalué en fonction de son poids, les greffes de SC se limitent souvent aux patients de masse corporelle limitée, donc en majorité aux enfants. De nombreux efforts sont fournis afin de trouver une méthode efficace pour favoriser l'expansion de ces CSH. Ceci permettrait une utilisation accrue des greffes de SC chez les donneurs adultes, ce qui aurait en soi un impact clinique important. De plus, la capacité de générer une procédure d'expansion des CSH pourrait avoir un impact sur la rapidité reconstitution hématologique du receveur.

### 3. L'hématopoïèse

Les cellules contenues dans le sang sont en grande majorité produites quotidiennement afin de renouveler les cellules dont la durée de vie est écoulée et celles détruites par la maladie ou encore par un traumatisme. Plusieurs mécanismes d'homéostasie permettent la production de cellules sanguines afin de répondre promptement aux situations de stress comme les saignements ou les infections. Ces mécanismes permettent également un retour de ces cellules à des niveaux normaux une fois la situation de stress maîtrisée. L'hématopoïèse compte donc sur un ensemble complexe de mécanismes de régulation qui permettent d'assurer la production adéquate de cellules des différentes lignées.

#### 3.1 *Les cellules souches hématopoïétiques*

Toutes les cellules sanguines matures du corps humain sont générées à partir d'un nombre relativement peu élevé de CSH et de progéniteurs<sup>19</sup>. Les CSH sont des cellules considérées comme ayant la capacité de se renouveler, de proliférer et de se différencier. Chaque CSH possède un potentiel énorme pour générer un grand nombre de cellules matures. Une étude utilisant un modèle murin a démontré qu'une seule CSH permet de reconstituer complètement le système hématopoïétique de l'animal, et ce pour la durée de vie naturelle de celui-ci<sup>20</sup>. Plusieurs études ont démontré que les CSH sont capables de générer des cellules de toutes les lignées retrouvées dans le système hématopoïétique, incluant les globules rouges, les plaquettes ainsi qu'une grande variété de cellules myéloïdes et lymphoïdes<sup>21,22</sup>. On les retrouve en majorité dans la MO, quoiqu'on en retrouve également dans le sang, le SC ainsi que dans plusieurs organes comme le foie et la rate<sup>23</sup>. Dans la majorité des organes, il est reconnu que les CSH sont quiescentes et ne deviennent actives que dans une situation où il y a une déplétion cellulaire considérable.

### 3.1.1 Les cellules CD34+

L'étude des CSH a été facilitée par l'identification, à la surface de ces cellules, d'un marqueur antigénique, soit l'antigène CD34, une sialomucine, qui est exprimée à la surface de 1 à 3% des cellules de la MO. Le CD34 est rapidement devenu une caractéristique distincte utilisée pour l'énumération, l'isolation et la caractérisation des cellules souches étant donné la régulation négative que subit l'expression de ce marqueur à mesure que les CSH se différencient en cellules plus matures<sup>24</sup>. Malgré sa vaste utilisation, la fonction normale de cette molécule reste énigmatique même si certaines études lui ont décrit un rôle potentiel dans l'adhésion cellulaire et le processus de « homing »<sup>25</sup>. L'expression du CD34 est conservée entre l'humain et la souris. Dans ces deux organismes, l'antigène CD34 est également exprimé en dehors du système hématopoïétique, soit sur les cellules endothéliales vasculaires et sur certains fibroblastes<sup>26</sup>. Des études de transplantation ont démontré, dans divers modèles animaux, que la repopulation à long terme de la MO peut être assurée par des cellules CD34+. De plus, la majorité des protocoles cliniques et expérimentaux pertinents sont conçus pour des cellules CD34+ sélectionnées par différentes méthodes. Cependant, une controverse majeure est apparue lorsque différents investigateurs ont découvert qu'une population significative de CSH dans la MO de souris normales n'exprimait pas le CD34. L'équipe d'Osawa a décrit que la fraction CD34-, lin-, Sca1+, c-kit + de la MO murine était capable d'assurer la reconstitution à long terme de souris ayant reçu une dose létale d'irradiation<sup>27</sup>. D'autres ont démontré que les CSH étaient retrouvées non seulement dans la fraction CD34+ mais aussi dans la fraction CD34- de la MO de souris<sup>28,29</sup>. De plus, des études utilisant deux méthodes de xénotransplantation ont indiqué que la population CD34- de la MO humaine contenait des cellules responsables de la repopulation à long terme<sup>30,31</sup>. Ces observations ont soulevé la possibilité qu'un nombre significatif de CSH pourraient être éliminées lors de la sélection de cellules CD34+ d'échantillons humains. Il a également été démontré que l'expression de CD34 reflétait l'état d'activation des CSH et que cette expression était réversible<sup>32</sup>. Une autre équipe a

observé que les cellules mobilisées, exprimant le marqueur antigénique CD34, retournent à la MO après leur infusion et deviennent CD34- lorsque la MO retrouve un état stable<sup>33</sup>.

### 3.1.2 *Autres marqueurs de CSH*

Un autre marqueur spécifique aux CSH, le CD133 (AC133), est co-exprimé avec CD34, c-kit et d'autres marqueurs de surface<sup>34,35</sup>. Ces études indiquent clairement que le CD133 représente un marqueur de surface significatif pour l'identification des CSH humaines, cependant on ne sait pas si ce marqueur fournit un avantage par rapport au CD34. Une autre méthode pour l'identification des CSH dans la MO murine a été décrite par Goodell et al<sup>36</sup>. Cette procédure exploite la propriété qu'ont les CSH de permettre d'incorporer un marqueur fluorescent. Les cellules incorporant faiblement le Hoechst 33342 (low) ont été isolées et désignées « side population ». On a démontré que ces cellules possédaient le même phénotype Lin-Sca1+CD34- indépendamment identifié chez les CSH de souris adultes<sup>37</sup> et cette « side population » a depuis été isolée dans la MO de différentes espèces, dont l'humain<sup>38</sup>. Cependant, les expériences de fonctionnalité de cette « side population » sont limitées jusqu'à présent, dont une étude faite sur du SC<sup>39</sup> et l'autre sur du foie fœtal humain<sup>40</sup>. Dans cette dernière étude, il a été démontré que ces cellules sont présentes à partir du deuxième trimestre dans le foie fœtal humain.

## 3.2 *Les progéniteurs hématopoïétiques*

Les CSH, une fois leur activation engagée, se différencient en progéniteurs hématopoïétiques plus matures. Ces cellules ont un pouvoir de différenciation et de maturation permettant d'assurer la présence dans le sang d'un nombre adéquat de cellules matures. Ces progéniteurs sont appelés pluripotents et peuvent s'engager dans deux lignées distinctes : la lignée lymphoïde et la lignée myéloïde.

### 3.2.1 *Progéniteurs lymphoïdes*

Les progéniteurs lymphoïdes se séparent en deux classes distinctes de progéniteurs : les progéniteurs des lymphocytes B et ceux des lymphocytes T. La maturation de ces progéniteurs amène à la formation de lymphocytes B et de lymphocytes T, ainsi que de cellules « natural killer »; ces cellules sont les principaux acteurs du système immunitaire.

### 3.2.2 *Progéniteurs myéloïdes*

Le progéniteur myéloïde le plus primitif est appelé CFU-GEMM (« colony forming unit granulocyte-erythrocyte-macrophage-megakaryocyte ») et possède, à ce stade, la possibilité de se différencier en plusieurs lignées cellulaires différentes. Une voie de différenciation que peuvent emprunter les CFU-GEMM est celle des CFU-GM GEMM (« colony forming unit granulocyte-macrophage »). Cette voie se divise ensuite en deux types de cellules matures, les granulocytes (qui originent de leurs précurseurs CFU-G) et les monocytes (qui originent de leurs précurseurs CFU-M). La principale fonction des granulocytes est d'éliminer les agents pathogènes et les particules vivantes (phagocytose et digestion) alors que celle des macrophages est de présenter l'antigène et de sécréter des cytokines.

Les CFU-GEMM peuvent également se différencier en BFU-E. Ces progéniteurs sont ceux qui produisent, après leur processus de maturation, les érythrocytes. Ces cellules sont nécessaires au transport de l'oxygène dans le sang.

En dernier lieu, les CFU-GEMM peuvent se différencier en CFU-Meg qui, suite au processus de maturation, deviendront des mégakaryocytes (MK), les cellules produisant les plaquettes. Ces derniers progéniteurs sont ceux auxquels nous avons porté le plus d'intérêt au cours du présent projet.

#### 4. La Mégakaryocytopoïèse

Nous savons depuis une centaine d'années que les plaquettes sont dérivées des mégakaryocytes (MK). Les MK sont des cellules hématopoïétiques plutôt rares représentant environ 0.02-0.05% des cellules nucléées de la MO. La rareté de ces cellules semble être compensée par deux attributs majeurs : 1) leur grande taille et leur cytoplasme abondant leur permet de produire plusieurs milliers de plaquettes par cellule; 2) leur noyau multilobé contenant plusieurs multiples du contenu normal de l'ADN (2N). La ploïdie normale des MK humains est ~16N. Ils sont principalement localisés dans la MO, cependant des MK peuvent être retrouvés dans pratiquement tous les organes, dont les poumons où ils sont particulièrement nombreux. Certains chercheurs ont stipulé que les MK entrent normalement dans la circulation sanguine à la fin de leur cycle de vie, qu'il sont véhiculés jusqu'aux poumons où, après un parcours rigoureux, ils relâchent les plaquettes<sup>41</sup>.

Les MK dérivent d'une CSH pluripotente. Une fois la cellule engagée dans la voie de différenciation, il y a formation des progéniteurs mégakaryocytaires. Leur fonction première est d'amplifier le nombre de cellules produisant des MK dans la MO. Le progéniteur mégakaryocytaire le plus immature est le BFU-MK (Burst Forming Unit - Megakaryocyte). Les BFU-MK donnent naissance à des colonies après environ 21 jours en culture et sont composés de multiples agrégats de cellules mégakaryocytaires. Les CFU-MK (Colony Forming Unit - Megakaryocyte) sont des cellules plus matures et ont été les premiers progéniteurs mégakaryocytaires à être identifiés<sup>42</sup>. Ces progéniteurs sont caractérisés par l'expression de CD34 et de la glycoprotéine IIb/IIIa (CD41). Leur fréquence dans le SC et le sang d'individus d'âge pédiatrique ou adulte est d'environ 5% des cellules CD34+, ce qui en fait une population de faible fréquence<sup>43</sup>. Les CFU-MK donnent naissance à des colonies d'un seul agrégat après 10 à 12 jours de culture. Les progéniteurs les plus matures sont les LD-CFU-MK (Light Density CFU-MK). Ces progéniteurs ont une faible capacité de prolifération et donnent naissance à de petites colonies dont les cellules possèdent une ploïdie élevée. Les

MK, voyant alors leur prolifération diminuer, entrent dans la phase terminale de leur maturation. Cette phase de développement terminale est caractérisée par une augmentation de la ploïdie des MK suivie par une maturation cytoplasmique complète<sup>44</sup>.

#### ***4.1 La thrombocytopénie***

L'importance de la thrombopoïèse dans le maintien de l'homéostasie dans des situations de thrombocytopénie a été démontrée il y a de nombreuses années. La thrombocytopénie est caractérisée par une diminution des plaquettes dans le sang. Tout comme la neutropénie ainsi que l'anémie, la thrombocytopénie est un problème d'une importance significative en hématologie et en oncologie clinique, en particulier pour les patients recevant des doses intensives de chimiothérapie ou d'autres traitements myéloablatifs. Alors que l'anémie et la neutropénie associées au cancer peuvent souvent être contrôlées par une utilisation judicieuse de facteurs de croissance qui sont disponibles pour l'usage clinique, la thrombocytopénie est beaucoup plus difficile à contrôler dans un contexte clinique. Or, les complications liées à la thrombocytopénie peuvent augmenter la morbidité, voire même la mortalité chez le patient cancéreux. De plus, la thrombocytopénie survient relativement fréquemment, soit à cause du cancer lui-même, surtout dans les cas de leucémie et de lymphome, ou de son traitement. De multiples régimes de chimiothérapie incluant des agents tels le carboplatine, l'ifosfamide et les taxanes, utilisés pour traiter des cancers tels le carcinome pulmonaire, le cancer des ovaires, les sarcomes et les lymphomes, sont souvent associés à une thrombocytopénie nécessitant une réduction de la dose du traitement afin d'éviter les complications hémorragiques.

#### ***4.2 Les transfusions plaquettaires***

Les transfusions plaquettaires demeurent le traitement privilégié de la thrombocytopénie. En effet, des transfusions prophylactiques de plaquettes ont été administrées durant de nombreuses années aux patients greffés dont le taux de



plaquettes descendait en deçà de  $20 \times 10^9/L$  dans le but de prévenir les problèmes hémorragiques<sup>45</sup>. Les principales hémorragies sont d'origine gastro-intestinales, pulmonaires et intracrâniennes. Les transfusions plaquettaires répétées constituent un moyen efficace pour prévenir les hémorragies. Cependant, elles sont associées à plusieurs inconvénients non négligeables. Tout d'abord, les plaquettes constituent une ressource limitée. Plusieurs unités de sang sont nécessaires pour récolter suffisamment de plaquettes pour avoir un effet thérapeutique chez le patient. Alternativement, il est possible de procéder à une thrombaphérèse, une procédure de collecte qui implique un appareillage sophistiqué et implique la disponibilité d'un donneur pour quelques heures. Il est aussi important de noter que si les globules rouges peuvent être conservés durant 42 jours, les plaquettes doivent être jetées après 5 jours. Cette courte durée de conservation, ainsi que la disponibilité limitée de donneurs de sang contribuent à une restriction chronique de l'approvisionnement en plaquettes<sup>46</sup>. En second lieu, les transfusions plaquettaires sont parmi les mesures de support les plus dispendieuses dans le domaine de l'hématologie et de l'oncologie. Pour les patients qui deviennent réfractaires aux transfusions de plaquettes conventionnelles, l'utilisation de plaquettes HLA compatibles augmente significativement les coûts reliés à cette thérapie. Ces patients, qui constituent de 15% à 40% des patients recevant des transfusions plaquettaires multiples, voient leur risques de complications hémorragiques augmenter considérablement<sup>47</sup>. De plus, de 5% à 30% des transfusions plaquettaires sont associées à une réaction fébrile, habituellement de type non hémolytique, de toute évidence causée par la réaction des anticorps HLA du patients avec les leucocytes du donneur ou encore par la présence de cytokines dans le plasma du donneur. Pour contrer ces inconvénients, des stratégies incluant la déplétion des leucocytes et le lavage plaquettaire ont été mises en place. Enfin, les infections associées aux transfusions constituent un autre risque de l'administration de plaquettes. De nombreuses techniques de dépistage, des tests sérologiques ainsi que des analyses d'ADN ont diminué significativement ces risques, cependant la transmissions de maladies par le sang demeure une préoccupation<sup>48</sup>.

## 5. Les cytokines

Les cytokines ou facteurs de croissance sont des régulateurs de l'homéostasie hématopoïétique. Ils exercent leur fonction en modulant la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Des cytokines spécifiques exercent une influence sur la survie des progéniteurs hématopoïétiques en empêchant ou en favorisant la mort cellulaire par apoptose. L'effet d'une cytokine déterminée sur une cellule précurseur dépend du stade de maturation de celle-ci, de la lignée cellulaire dans laquelle elle est engagée ainsi que de l'exposition concurrentielle de cette cellule à d'autres facteurs de croissance. La recherche, au cours des dernières années, a permis d'identifier plusieurs cytokines ainsi que leur rôle dans le processus de l'hématopoïèse et de la mégakaryocytopoïèse. Nous décrivons ici les facteurs de croissance les plus impliqués dans la mégakaryocytopoïèse. Même si la thrombopoïétine (TPO) semble occuper un rôle majeur dans la régulation de la production des MK et des plaquettes, d'autres cytokines connues ont un impact sur les cellules de cette lignée. Plusieurs études ont démontré que l'IL-3 et le GM-CSF ont une activité stimulatrice sur les MK alors que d'autres facteurs comme l'IL-6, l'IL-11, le G-CSF et le SCF n'ont d'effet sur les cellules de la lignée MK qu'en synergie avec l'IL-3 et le GM-CSF.

### 5.1 *IL-6*

L'IL-6 a été identifiée, à l'origine, comme un facteur induisant la production des immunoglobulines dans les lymphocytes B activés. Plusieurs cytokines font partie de la famille de l'IL-6 : l'IL-11, le Leukemia Inhibiting Factor (LIF) et l'oncostatin M (OSM). Depuis, il a été démontré que cette cytokine a un effet pléiotropique sur différents types de cellules, dont celles du système immunitaire et du système hématopoïétique. L'un de ces effets est la promotion de la thrombopoïèse. En effet, dans des cultures liquides de MO murine, l'IL-6 entraîne une augmentation remarquable de la taille des MK et de leur ploïdie ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'acétylcholinestérase (AChE) (marqueur

typique de la maturation des MK) sans pour autant avoir un effet notable sur la formation de colonies mégakaryocytaires<sup>49</sup>. L'administration d'IL-6 à des souris entraîne une augmentation du nombre de plaquettes dans le sérum d'une manière dose-dépendante<sup>50</sup>. Ces observations indiquent que l'IL-6 et les cytokines de la même famille favorisent la maturation mégakaryocytaire. Il existe un important effet entre les cytokines de la famille de l'IL-6 avec l'IL-3 ou le SCF. Ces derniers facteurs de croissance sont reconnus comme des promoteurs de la prolifération des progéniteurs mégakaryocytaires<sup>51</sup>. Lorsqu'on combine des cytokines de la famille de l'IL-6 à ces facteurs, on obtient la croissance et la maturation des MK.

Des essais cliniques vérifiant l'effet de l'IL-6 n'ont montré qu'un modeste effet thrombopoïétique et une toxicité significative. Après une greffe autologue chez des patientes atteintes d'un cancer du sein, seul un effet minime sur la reprise du taux de plaquettes suite à l'administration d'IL-6 a été observé. De plus, la toxicité du traitement a été observée par l'augmentation de troubles veino-occlusifs du foie. Une étude de phase I a été effectuée sur des patients atteints de syndrome myélodysplasique<sup>52</sup>. L'étude a démontré que même si 36% d'un petit groupe de patients ont observé une augmentation transitoire de leur taux de plaquettes, la toxicité du traitement était significative. De plus, une anémie rapide et réversible a été observée dans cette étude ainsi que dans d'autres études<sup>53</sup>, anémie secondaire à un effet de dilution causé par l'augmentation du volume plasmatique. Cette toxicité a été jugée inacceptable et l'usage de cette cytokine en clinique a été interdit. L'IL-6 est un médiateur important de l'inflammation et entraîne des effets secondaires incluant des maux de tête, de la fièvre ainsi que de la douleur musculaire. L'IL-6 augmente probablement les plaquettes en stimulant une réponse inflammatoire plutôt qu'en stimulant les MK<sup>54</sup>.

## 5.2 IL-11

L'IL-11 a été décrit à l'origine comme un facteur de croissance dérivé des cellules stromales. Cette cytokine fait également partie de la famille de l'IL-6. Son action, incluant son pouvoir de stimulation de la survie, a été démontrée sur une multitude de lignées hématopoïétiques<sup>55</sup>. Cependant, son effet n'est pas restreint à l'hématopoïèse. Par exemple, il a été démontré que l'IL-11 stimule la reprise de la spermatogénèse suivant la chimiothérapie<sup>56</sup>. L'effet de l'IL-11 ne semble cependant pas être essentiel au processus d'hématopoïèse, que ce soit en situation de stress ou en quiescence. En effet, des souris ayant un défaut de leur réponse à l'IL-11 montrent des indices sanguins comparables à ceux d'une souris normale. De plus, leur niveau de progéniteurs ainsi que la fonction de ceux-ci sont normaux<sup>57,58</sup>. L'IL-11, lorsqu'elle est seule, n'exerce aucun effet stimuloire sur les progéniteurs MK. Cependant, lorsqu'elle est seule ou en combinaison avec l'IL-3, l'IL-11 pourrait être impliquée dans certaines facettes de la maturation des MK, incluant l'augmentation de la ploïdie des MK, de leur taille ainsi que de leur production d'acétylcholinestérase<sup>59</sup>. De plus, l'IL-11 augmente l'effet d'autres cytokines telles l'IL-3, le SCF et la TPO sur les MK<sup>60,61</sup>. La controverse existe encore à savoir si l'IL-11 exerce son effet directement ou indirectement sur les MK. En effet, il a été démontré, sur une population cellulaire sélectionnée par le marqueur phénotypique CD41, exprimé sur les MK, que l'IL-11 seule augmentait les marqueurs de maturation sur ces cellules<sup>62</sup>. D'autres études soutiennent que cette action serait médiée par d'autres cytokines telles que l'IL-6<sup>63</sup> ou encore la TPO<sup>64</sup>.

L'étude *in vivo* de l'IL-11 a démontré que l'injection de ce facteur de croissance à des souris permettait l'augmentation du taux de plaquettes sanguines, accompagné d'une hausse de MK et des progéniteurs dans la MO<sup>65</sup>. De plus, l'expression accrue de l'IL-11 dans d'autres souris a témoigné d'une hausse accrue des plaquettes et des MK<sup>66</sup>. Des études cliniques ont également été entreprises avec l'IL-11. Des patientes atteintes d'un cancer du sein recevant d'intenses doses de

chimiothérapie ont fait partie d'une étude de phase I. Cette étude a démontré un effet dose-dépendant lorsque l'IL-11 est administré avant la chimiothérapie, réduisant le degré de la thrombocytopénie<sup>51</sup>. Une autre étude comprenait des patients atteints d'un cancer qui souffraient d'une intense thrombocytopénie suite à un protocole de chimiothérapie conventionnelle. Une proportion statistiquement significative de patients auxquels on a administré de l'IL-11 n'ont pas eu besoin de transfusion plaquettaire suite à la chimiothérapie lorsqu'on compare aux patients du groupe placebo<sup>67</sup>. De plus, les patients du groupe traité à l'IL-11 ayant nécessité des transfusions plaquettaires ont vu ce nombre de ces transfusions diminué. Une certaine toxicité de l'IL-11 a été observée, entraînant des symptômes comme l'arythmie. Comme cet effet semblait causé par l'expansion du volume sanguin, une pression plus élevée de systole et de diastole, un diurétique a été prescrit. Ces ajustements ont permis l'approbation de l'IL-11 par la FDA pour son effet thrombopoïétique.

### 5.3 *Thrombopoïétine (TPO)*

La TPO, aussi appelé ligand Mpl ou « megakaryocyte growth and development factor » (MGDF), est un facteur de croissance produit de façon constitutive par le foie et les reins. Son ligand est le récepteur c-mpl, dont l'expression est restreinte aux MK, aux plaquettes et aux cellules CD34+ dans la MO humaine<sup>68</sup>. De nombreuses études ont démontré le rôle central qu'occupe la TPO dans le développement complet des MK et des plaquettes<sup>69-71</sup>. Cependant, cette cytokine pourrait être facultative pour les dernières étapes de la maturation des MK<sup>72</sup>. L'obtention de souris c-mpl<sup>-/-</sup> et TPO<sup>-/-</sup> a permis une démonstration évidente de l'action dominante de la TPO sur la production de plaquettes<sup>73,74</sup>. Les animaux homozygotes montrent un phénotype identique avec une diminution de 80-90% du taux de plaquettes et une réduction marquée du nombre de MK possédant une faible ploïdie dans la MO et dans la rate. Cependant, le taux de globules rouges et de leucocytes est normal chez ces animaux. Les souris c-mpl<sup>-/-</sup> et TPO<sup>-/-</sup> montrent une diminution de 60% du nombre absolu de tous les progéniteurs

myéloïdes, incluant les progéniteurs primitifs<sup>75,76</sup>. Ceci indique que la TPO joue un rôle non seulement au niveau de la mégakaryocytopoïèse, mais qu'elle exerce un effet pléiotropique dans l'hématopoïèse<sup>77,78</sup>. Plusieurs études *in vitro* démontrent que la TPO agit en synergie avec des cytokines à action précoce comme le Flt3 ligand, le SCF ou l'IL-3 pour stimuler directement la prolifération des CSH primitives<sup>79-82</sup>. De plus, le TPO augmente l'expansion et la survie des progéniteurs CD34+CD38- en culture<sup>83</sup>.

Le rôle de la TPO a également été évalué *in vivo*. Des animaux normaux ayant reçu des injections répétées de TPO ont vu leur taux de plaquettes augmenter significativement. Cette augmentation a été accompagnée par une hausse des progéniteurs MK et des MK<sup>84,85</sup> et ce sans affecter les niveaux de globules rouges et de leukocytes. De plus, l'injection de rHuMGDF à des souris a permis de renverser la thrombocytopénie qui leur avait été causée par une injection de carboplatin<sup>86</sup>. Dans des modèles de thrombocytopénie plus sévère, l'administration de ce facteur de croissance a diminué l'ampleur du nadir plaquettaire, accéléré la reprise du taux de plaquettes et diminué la mortalité<sup>87,88</sup>.

Des études cliniques de phase I/II avec la TPO ont également été effectuées<sup>89,90</sup>. Dans l'une de ces études, le Peg-rHuMGDF a été injecté à diverses doses à des patients souffrant d'un cancer avancé et ce avant la chimiothérapie. L'augmentation du taux de plaquettes a débuté au jour 6, a plafonné entre 12 et 18 jours et s'est prolongé jusqu'au 26<sup>ième</sup> jour<sup>91,92</sup>. Aucun signe de toxicité ou d'ischémie n'est apparu durant le traitement. Cependant, lors de situations où les patients ont une thrombocytopénie sévère induite par des protocoles de chimiothérapie plus drastiques, l'effet thérapeutique de la TPO s'est avéré modeste, voire insignifiant<sup>93</sup>. Certain effets néfastes ont été observés suite à l'injection du PEG-rHuMGDF<sup>94,95</sup>. En effet, le développement chez des sujets normaux d'anticorps neutralisants qui inhibaient non seulement la cytokine recombinante mais également la TPO endogène, provoquant la thrombocytopénie, a poussé le manufacturier (Amgen Inc) à retirer ce produit des essais cliniques aux

États-Unis en 1998. Il a été postulé que la voie d'administration sous-cutanée pourrait permettre aux cellules dendritiques de la peau de transformer le PEG-rHuMGDF et d'augmenter son antigénicité<sup>96</sup>. L'administration du rhTPO a permis, quant à elle, l'augmentation dose-dépendante du taux de plaquettes chez des patients atteints de sarcomes<sup>97</sup> et de cancers gynécologiques<sup>98</sup>. Ce traitement a été bien toléré et le développement d'anticorps neutralisants n'a pas été observé. Ceci pourrait être dû au fait que le rhTPO est administré par voie intra-veineuse au lieu de sous-cutanée<sup>96</sup>.

#### **5.4 Stem Cell Factor (SCF)**

Le SCF, aussi connu sous le nom de « Steel Factor » ou de « c-kit ligand », est le ligand du récepteur c-kit, un récepteur associé au développement d'une activité tyrosine kinase retrouvé sur une variété de progéniteurs hématopoïétiques précoces. Le SCF a un effet à la fois sur les progéniteurs hématopoïétiques multipotents et sur les cellules effectrices plus matures<sup>99</sup>. Utilisé seul, le SCF ne possède pas ou très peu d'activité stimuloire sur la MO humaine. Cependant, lorsqu'employé en combinaison avec d'autres facteurs de croissance hématopoïétiques, il promeut la croissance des progéniteurs myéloïdes, érythroïdes et mégakaryocytaires<sup>100-102</sup>. Les combinaisons de cytokines incluant le SCF ont montré une action directe sur des populations purifiées de progéniteurs primitifs<sup>103,104</sup> en accélérant leur entrée dans le cycle cellulaire<sup>105</sup>. La prolifération *in vitro* des CSH en présence du SCF seul n'a pas été observée<sup>106</sup>. Il a été démontré que la brève exposition de la MO murine à un cocktail de cytokines composé de SCF, d'IL-3, d'IL-6 et d'IL-11 a provoqué une expansion des cellules progénitrices, cependant cette expansion a affecté l'habilité de repopulation à long terme de ces cellules<sup>107</sup>. Cette observation a poussé les chercheurs à être vigilants dans le choix des cytokines utilisées. L'inclusion de l'IL-3 dans les cocktails de cytokines tend à réduire la capacité de reconstitution hématologique à long terme, suggérant que l'IL-3 entraîne la différenciation au détriment du maintien de l'activité des cellules souches<sup>108</sup>.

L'injection du SCF à des souris entraîne une redistribution massive des progéniteurs primitifs de la MO vers le sang et la rate<sup>109,110</sup>. Il est également reconnu que l'utilisation du SCF en combinaison avec le G-CSF augmente considérablement la mobilisation des progéniteurs du sang qui est obtenue avec le G-CSF seul ou le SCF seul<sup>111,112</sup>. Le pré traitement avec le SCF de souris ayant reçu une irradiation létale exerce un effet de protection sur ces souris<sup>113</sup>. De plus, il a été montré que le SCF pouvait ramener un taux normal de plaquettes chez des souris traitées au 5-FU<sup>114</sup>. Le SCF semble donc impliqué, à la fois de façon directe et indirecte, dans le processus de mégakaryocytopoïèse.



## 6. L'expansion *ex vivo* de cellules souches hématopoïétiques

Il est reconnu depuis de nombreuses années que la transplantation de cellules souches hématopoïétiques est une thérapie définitive pour une variété de maladies malignes ainsi qu'héréditaires. De plus, elle permet un robuste support myéloïde pour les patients recevant de la chimiothérapie intensive ou de la radiothérapie. Cependant, cette pratique a longtemps été limitée. Tout d'abord, la récolte des cellules par ponction médullaire ou par aphérèse est un processus qui implique soit une anesthésie générale ou régionale, soit une instrumentation sophistiquée, avec un risque inhérent, bien que limité, pour les patients. En second lieu, malgré un prélèvement réussi des cellules, il se peut que leur nombre soit insuffisant pour la reconstitution du patient. Enfin, la cinétique de régénération des cellules matures du sang après la transfusion n'est pas idéale, entraînant par le fait même une période allant de 1 à 3 semaines pendant laquelle le patient démontre des cytopénies importantes. Durant la dernière décennie, de nombreux scientifiques se sont attaqués à ces obstacles en effectuant de la culture *in vitro* contrôlée dans l'optique d'augmenter le nombre et le rythme de prolifération des cellules hématopoïétiques primitives avant leur infusion. Les techniques d'expansion *ex vivo* se sont développées durant les dernières années à un point tel que plusieurs études cliniques sont présentement en cours. L'élaboration de milieux de culture semi-solides permettant d'identifier directement les cellules hématopoïétiques primitives *in vitro* par la propriété qu'elles ont de former des colonies (colony-forming assay)<sup>115</sup> a été un atout majeur. Ce type de milieu a permis aux investigateurs de visualiser certaines propriétés de la biologie des cellules progénitrices de faible fréquence et qui demeurent invisibles autrement.

L'objectif de plusieurs groupes a été l'expansion des cellules souches. Si le renouvellement des cellules souches était possible *in vitro*, on pourrait donc générer une plus grande quantité des cellules souches. Cependant, peu de données ont été publiées démontrant une expansion significative des cellules souches. Il est possible qu'en réponse aux conditions de culture employées, la

stimulation de la division des cellules souches résulte en leur différenciation menant, au bout du compte, à leur maturation<sup>116</sup>. Plusieurs théories ont été proposées concernant les CSH. Une de celles-ci stipule que les CSH ont une capacité de renouvellement limitée et que durant l'embryogénèse, un nombre suffisant de cellules souches a été généré. La capacité de prolifération des cellules souches, c'est à dire jusqu'à 50 divisions cellulaires, fournit un nombre suffisant de cellules sanguines pour la durée de vie normale d'un être humain. De nombreux stress, entre autres de multiples cycles de chimiothérapie, pourraient mener à l'épuisement de la réserve de cellules souches. Cependant, HOXB4, un membre de la famille de gènes HOX qui est impliquée dans la régulation de l'hématopoïèse démontre une importante capacité (augmentation jusqu'à 1000 fois) à expandre les CSH de souris<sup>9,117-120</sup> et potentiellement d'humains<sup>121</sup>. De plus, il est possible d'utiliser d'autres agents pour l'expansion de CSH, tels que Wnt<sup>122,123</sup>, ou des stratégies d'ARN antisens dirigées contre PBX1, un co-facteur de HOXB4<sup>124</sup>. Ceci dit, ces stratégies demeurent à un stade expérimental.

### **6.1 Expansion ex vivo des progéniteurs mégakaryocytaires**

De nombreux efforts ont été fournis pour le développement de nouvelles stratégies visant à contrer la thrombocytopénie secondaire à des traitements induisant une myéloablation, tels la chimiothérapie. Un bon nombre de groupes ont tenté d'induire la différenciation de cellules souches hématopoïétiques CD34+ vers différentes lignées hématopoïétiques, dont les MK. Une corrélation a été établie entre le nombre absolu de cellules CD34+/CD41+ dans le greffon de sang et le temps nécessaire à la reprise des plaquettes<sup>125,126</sup>, suggérant fortement un rôle des progéniteurs dans la reprise plaquettaire précoce observée après une GCSH. Dans les dernières années, des protocoles précliniques et cliniques d'expansion *ex vivo* des cellules mégakaryocytaires de la MO, du SC et du sang d'individus adultes ont été développés afin de tenter de faciliter le rétablissement du taux de plaquettes.

## 6.2 Sources de cellules pour l'expansion des MK

Il n'est pas encore clairement démontré s'il existe des différences considérables au niveau du potentiel de prolifération des progéniteurs mégakaryocytaires des différentes sources de cellules hématopoïétiques (sang, MO, SC). Cependant, certaines données démontrent que le choix de la source cellulaire appropriée pour l'expansion des MK est un élément essentiel afin de déterminer l'efficacité de l'expansion. Par exemple, le SC a fréquemment été utilisé pour l'expansion *ex vivo* étant donné que ce sang possède une grande quantité de cellules souches et de progéniteurs. Un groupe a démontré que les CSH provenant du SC possèdent une capacité de prolifération plus grande en réponse à la TPO que celles provenant de la MO<sup>127</sup> et qu'elles constitueraient une source de cellules plus efficace pour la production de MK. En effet, les cellules CD34+ provenant du SC, après 14 jours de culture, ont généré un nombre significativement plus élevé de cellules nucléées totales ainsi que de MK que les cellules CD34+ provenant de la MO. De plus, un autre investigateur a démontré que les cellules CD34+ de SC pouvaient engendrer plusieurs milliers de cellules matures, et ce sans affecter le nombre initial de cellules CD34+. Au contraire, les cellules CD34+ de la MO déclinent rapidement en culture, indiquant la perte des cellules primitives capables de se renouveler<sup>128</sup>. Enfin, un nombre beaucoup plus élevé de MK a été généré à partir de cellules CD34+ de SC en présence de TPO et d'IL-3<sup>129</sup>. Dans une autre étude, la comparaison a été faite entre l'expansion des cellules CD34+ du sang et de MO en présence de SCF, d'IL-3, d'IL-6 et de G-CSF<sup>130</sup>. Ils ont démontré que les cellules provenant du sang mobilisé permettaient une expansion supérieure des progéniteurs MK CD41+ que les cellules provenant de la MO et ce, peu importe la combinaison de cytokines utilisée.

## 6.3 Combinaison de cytokines pour l'expansion des MK

Plusieurs études ont démontré que la prolifération des CSH primitives, ainsi que celle des progéniteurs précoces de la lignée des MK, est stimulée de façon optimale par l'interaction synergique de plusieurs facteurs de croissance plutôt

que par un seul de ces facteurs de croissance. L'effet de différentes combinaisons de 6 cytokines ( SCF, IL-3, IL-6, G-CSF, TPO, GM-CSF) sur les MK et sur les cellules de la lignée granulocytaire a été testé sur les cellules CD34<sup>+</sup> du sang<sup>131</sup>. En considérant l'IL-3 et le SCF comme combinaison de base de cytokines pour l'expansion des MK, l'addition d'IL-6, de TPO ou de GM-CSF permet d'induire une augmentation considérable des MK et des CFU-MK en culture. De plus, même si l'on reconnaît à la TPO un rôle de principal régulateur des cellules de la lignée MK, son effet était amplifié en présence d'IL-6, cette combinaison augmentant de 4.4 fois le nombre de MK et de 3.7 fois la quantité de CFU-Mk par rapport à la TPO seule. L'interaction entre la TPO et d'autres cytokines agissant sur les MK a également été étudiée sur des cellules CD34<sup>+</sup> dans un milieu sans sérum<sup>132</sup>. La présence d'IL-1, d'IL-6, d'IL-11 et de SCF permet une augmentation de 7 fois des CFU-MK et de 120 fois des cellules CD41<sup>+</sup> alors qu'en ajoutant de la TPO, l'augmentation des CFU-MK est de 17 fois et celle des cellules CD41<sup>+</sup> est 200 fois. Le Flt-3 ligand exerce un effet similaire à celui de la TPO dans ces expériences. Ces données supposent une importante interaction entre les différentes cytokines dans le développement des MK et indiquent que le choix des cytokines utilisées pourrait avoir un impact substantiel sur les différents stades de l'expansion *ex vivo* des MK.

Une autre équipe a évalué la possibilité de promouvoir l'expansion des CFU-MK dans une culture à courte durée de 7 à 10 jours<sup>133</sup>. Ils ont démontré que différentes combinaisons comprenant la TPO, le SCF, l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-11 pouvait produire une expansion de 40 à 80 fois des CFU-MK et que ces cellules formaient des colonies plus rapidement que les cellules non stimulées par des cytokines. *In vivo*, les souris irradiées ayant reçu un greffon stimulé par ces cytokines ont vu une restauration plus rapide (3 à 5 jours) de leur taux de plaquettes que les souris ayant reçu de la MO fraîche. L'incubation de cellules CD34<sup>+</sup> du SC avec de la TPO, du SCF, de l'IL-6 et le récepteur soluble de l'IL-6 ont démontré une augmentation de la production des MK d'une manière dose dépendante<sup>134</sup>. Une autre étude a destiné ses efforts à produire des MK à partir de

sang mobilisé pour suppléer les autogreffes conventionnelles<sup>135</sup>. Ils ont utilisé le SCF, le MGDF supplémenté ou non de G-CSF dans un milieu de culture ne contenant pas de sérum. Les cellules CD34+ ont eu une expansion de 5.2 fois et 3.4 fois après 6 et 9 jours, cependant aucune cellule CD34+ n'a pu être détectée après 13 jours. Les cellules CD41+ ont eu une expansion exponentielle durant 13 jours. La conclusion principale de cette étude stipule que la combinaison du MGDF et du SCF permet une expansion des cellules CD34+/CD41+.

Un nombre significatif de progéniteurs hématopoïétiques et de progéniteurs MK peuvent être générés *in vitro* en utilisant différentes combinaisons de facteurs de croissance. Même si les mécanismes de synergie entre ces facteurs de croissance ne sont pas clairs, des hypothèses ont été émises concernant l'augmentation du nombre de récepteurs à la surface des cellules cibles, l'activation de cellules accessoires et la stimulation de la production de cytokines secondaires.

#### 6.4 Études cliniques

L'expansion *ex vivo* des MK est une thérapie cellulaire relativement nouvelle et graduellement plus étudiée en clinique. Certaines études précliniques et cliniques ont démontré que l'administration de cellules MK obtenue par l'expansion *ex vivo* est sécuritaire et bien tolérée, qu'elle n'est accompagnée d'aucune toxicité sérieuse ou de contamination bactérienne. Bertolini et al. ont effectué une étude clinique pour évaluer l'effet de l'administration de cellules MK obtenues par l'expansion *ex vivo* des cellules de sang sur les niveaux de plaquettes après la transplantation<sup>136</sup>. Ils ont observé *in vitro* une augmentation de 8 fois des cellules CD34+/CD61+, de 17 fois des CFU-MK et de 58 fois des cellules CD61+ totales en présence de TPO, de SCF, d'IL-3, d'IL-6, d'IL-11, de Flt-3 ligand et du macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ). Quoique la thrombocytopénie n'ait pu être totalement évitée, deux des quatre patients ayant reçu de fortes doses de cellules CD61+ n'ont pas eu besoin de transfusions plaquettaires. De plus, aucun effet secondaire majeur n'a été noté chez les patients ayant reçu des cellules

MK générées par l'expansion *ex vivo*. Ces résultats suggèrent cependant que de fortes doses de MK devraient être administrées pour l'élimination complète de la thrombocytopénie chez les patients ayant reçu de fortes doses de chimiothérapie.

D'autres études cliniques ayant pour objectif l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques ont observé les avantages de cette technique non seulement au niveau de l'amélioration de la reprise plaquettaire mais aussi celle des neutrophiles et des érythrocytes. Une étude concernait des patientes atteintes d'un cancer du sein recevant une GCSH autologue<sup>137</sup>. Les cellules mobilisées non sélectionnées de ces patients ont été mises en culture avec du SCF, du G-CSF et du MGDF durant 9 à 14 jours et les cellules ont été réinjectées aux patientes après la fin de leur traitement de chimiothérapie. Il a été démontré que l'augmentation du temps de culture de 9 à 14 jours permet une plus grande augmentation du nombre total de cellules et une expansion des MK alors que l'augmentation de la densité des cellules lors de la culture entraîne l'effet contraire. Ces patients ont eu une reprise accélérée des neutrophiles, des plaquettes et des globules rouges ainsi qu'une hospitalisation de plus courte durée ( $p < 0.001$  pour tous les paramètres) que les contrôles historiques.

Les greffes de SC sont de plus en plus utilisées suite aux les traitements myéloablatifs. Cependant, elles sont plus fréquemment associées à une prise de greffon retardée ou encore inexistante pour les patients adultes. L'expansion *ex vivo* est, dans le cas des greffes de SC, une option avec un potentiel thérapeutique des plus intéressants. Une étude comprenant des patients souffrant d'hémopathies malignes ou encore d'un cancer du sein ont reçu de fortes doses de chimiothérapie avant une greffe allogénique de SC<sup>138</sup>. Une fraction du greffon de ces patients (40% ou 60%) a été sélectionnée positivement pour le marqueur de cellules souches CD34+ et ces cellules ont été mises en culture durant 10 jours avec du SCF, du MGDF et du G-CSF avant d'être réinfusées simultanément avec le reste du greffon non manipulé. Le temps moyen de reprise des neutrophiles était de 28 jours et celui des plaquettes de 106 jours et après un suivi des patients de 30 mois,

on observait 35% de survie chez ces patients. Cette étude démontre que la sélection CD34+ et l'expansion *ex vivo* du SC avant la greffe est possible mais qu'une optimisation doit cependant être effectuée, surtout au niveau de la GVHD présente chez un bon nombre de patients recevant ce genre de greffons.

La disponibilité de cytokines recombinantes et de différentes techniques pour la purification des cellules *in vitro* a permis de développer différentes stratégies pour l'expansion *ex vivo*. Un grand nombre de données préliminaires et cliniques sont encourageantes pour les patients recevant de fortes doses de chimiothérapie. Des problèmes importants persistent au niveau de l'accès clinique à des cytokines pouvant jouer un rôle dans l'expansion des CSH, ces cytokines étant soit non utilisables chez l'homme, soit qu'elles nécessitent une utilisation combinatoire d'application complexe. D'autres expériences seront nécessaires dans le futur pour développer des techniques pour améliorer l'efficacité de l'expansion. Il faudra établir des conditions de culture simples, reproductibles et fiables pour l'utilisation routinière de cette technique en clinique et l'établissement de la composition, de la dose, de la durée de culture et de l'horaire de transfusion du produit de la culture pour le maintien d'un effet thérapeutique à long terme.

## 7. Expansion *ex vivo* avec le PDFM

Le Platelet Derived Factor Mix (PDFM) est un mélange de facteurs de croissance extrait de plaquettes porcines matures. Obtenues par la lyse osmotique, les protéines recueillies ont été lyophilisées et resuspendues dans de l'eau. Certains constituants de ce composé ont été établis<sup>139</sup>. L'albumine (36.9 µg), la thrombospondine (17.4 µg), la fibronectine (20.1 µg), le PDGF (AA, AB, BB) (0.269 µg), le TGF-β1 (0.217 µg) et le TGF-β2 (0.145 µg) ont été identifiés par profil HPLC. Il a également été démontré que le PDFM ne contenait aucune trace d'Epidermal Growth Factor (EGF), de Vascular Endothelial Growth Factor Vascular-Fibroblast Growth Factor (V-FGF), de Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et d'IL-1β, des facteurs impliqués dans la reconstitution tissulaire. Cependant, il est possible que le PDFM contienne d'autres composantes, incluant des cytokines non identifiées jusqu'à maintenant. Comme le PDGF est une cytokine reconnue pour son activité sur les progéniteurs mégakaryocytaires et qu'elle se retrouve dans les plaquettes, nous avons postulé que les plaquettes elles-mêmes pouvaient jouer un rôle dans la mégakaryopoïèse. Dans ce contexte, les différentes composantes des plaquettes devraient favoriser la production de mégakaryocytes de façon plus importante que des facteurs de croissance seuls.

Des travaux préliminaires effectués dans notre laboratoire par Beauger et al. ont démontré que le PDFM exerçait une augmentation du nombre total de cellules et de certains progéniteurs immatures du sang périphérique mobilisé<sup>140</sup>. Nous avons donc voulu déterminer si cet effet pouvait également être observé *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin ainsi qu'avec une autre source de cellules humaines, le SC. De plus, nous avons voulu vérifier si cette expansion pouvait se traduire en une diminution de la cytopénie qui accompagne généralement les traitements myéloablatifs précédant la GCSH.



## 8. Description du projet de maîtrise

Ce projet de maîtrise a permis d'évaluer le pouvoir d'un extrait de plaquettes porcines, le Platelet Derived Factor Mix (PDFM), à promouvoir l'expansion *ex vivo* de progéniteurs hématopoïétiques murins et humains et à évaluer l'effet de cette expansion sur la cytopénie post greffe chez des souris irradiées. Nous avons ainsi incubé des greffons de MO avec du PDFM afin de générer une quantité plus grande de progéniteurs. Les cellules expansées *in vitro* ont aussi été réinjectées à des souris après irradiation létale afin d'évaluer leur activité *in vivo*. Nous avons aussi évalué la capacité de cet extrait plaquettaire à induire une expansion des progéniteurs hématopoïétiques humains obtenus à partir de SC. Ces études ont été réalisées dans le but de déterminer la capacité du PDFM à fournir rapidement une grande quantité de cellules hématopoïétiques dans le sang circulant de sujets irradiés et ainsi de permettre une reprise plus rapide de leur équilibre hématologique.

### 8.1 Procédure expérimentale

Ce projet impliquait la mise au point de conditions de cultures optimales de cellules provenant de la MO de souris saines ainsi que de cellules CD34+ provenant du SC de donneurs consentants. De plus, ce projet a nécessité l'élaboration d'un modèle de GCSH autologue permettant une distinction entre les cellules du donneur et du receveur.

#### 8.1.1 La culture liquide de progéniteurs hématopoïétiques

L'élaboration de conditions de culture liquide optimales pour l'expansion *in vitro* constitue une étape des plus importante. Les cellules de la MO murine ou encore les cellules CD34+ de SC sont mises en culture dans des milieux de culture contenant ou non du PDFM pour une culture à court terme. L'essai de différentes conditions de culture avec l'ajout de sérum ou encore de différentes cytokines a donc été faite via l'évaluation des progéniteurs hématopoïétiques.

### 8.1.2 *L'évaluation des progéniteurs myéloïdes murins et humains*

L'évaluation des progéniteurs myéloïdes murins et humains a été effectuée à l'aide de milieux semi-solides spécialisés à base de méthylcellulose (Stem Cell Technologies) permettant la croissance des colonies CFU-GM, CFU-G, CFU-M et CFU-GEMM. Ainsi, nous avons pu comparer la quantité de progéniteurs myéloïdes présents dans notre population cellulaire avant la culture et après 2, 4 et 6 jours de culture et ainsi évaluer la capacité du PDFM à promouvoir la prolifération de ces progéniteurs.

### 8.1.3 *L'évaluation des progéniteurs mégakaryocytaires murins et humains*

L'évaluation des progéniteurs mégakaryocytaires humains et murins a également été effectuée à l'aide de milieux disponibles commercialement (Stem Cell Technologies) à base de collagène et favorisant le croissance des colonies mégakaryocytaires. Après une période de culture déterminée, le milieu de culture est déshydraté et une coloration à l'acétylcholinestérase a été effectuée pour les progéniteurs murins alors qu'on effectue une coloration avec l'anticorps anti-GPIIbIIIa pour les progéniteurs MK humains. Un décompte des colonies positives peut ensuite être réalisé.

### 8.1.4 *La greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH)*

Les souris receveuses C57BL/6J (Ly5.2), après avoir reçu une dose d'irradiation létale, furent reconstituées avec de la MO fraîche de souris B6SJL (Ly5.1), pour notre groupe contrôle, ou encore avec de la MO ayant été mis en culture durant 2 jours avec le PDFM, avec le SCF ou la TPO, ou encore avec le PDFM et une de ces cytokines. La reprise hématologique (plaquettes, globules rouges, globules blancs et neutrophiles) a été évaluée à partir de 6 jours post-greffe à l'aide de décomptes et de frottis sanguins. De plus, la prise du greffon a pu être évaluée à

l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques aux molécules de surface Ly5.1 et Ly5.2.

Cette série d'expérience nous a permis d'étudier le potentiel du PDFM à induire l'expansion *ex vivo* des progéniteurs hématopoïétiques murins et humains en plus de nous renseigner sur l'effet *in vivo* de cette expansion sur la reprise hématologique globale dans un modèle murin de GCSH.

## **8.2 Objectif principaux du projet**

Au cours de ce projet, nous avons tenté de rencontrer les objectifs suivants :

- Déterminer l'effet du PDFM sur les progéniteurs myéloïdes, érythroïdes et mégakaryocytaires murins et humains.
- Déterminer les conditions optimales de culture avec le PDFM afin de promouvoir une expansion maximale des progéniteurs hématopoïétiques.
- Déterminer si la culture *in vitro* d'un greffon de cellules hématopoïétiques murines avec le PDFM permet une diminution significative de la durée de la cytopénie induite par un traitement myéloablatif.

## **ARTICLE**

## EFFECT OF A PLATELET EXTRACT ON EX VIVO EXPANSION OF HEMATOPOIETIC PROGENITORS

Marie-Pier Giard\*, Gorazd Krosl\*, and Denis Claude Roy\*

\*Division of Hematology-Immunology, Guy-Bernier Research Centre, Hôpital Maisonneuve-Rosemont; Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada.

DCR is the recipient of a clinician-scientist award of the F.R.S.Q.  
Supported by a grant from Celmed BioSciences and the Cancer Research Society of Canada.

**Key words :** *Ex vivo* expansion, Platelets, Hematopoietic progenitor cells, Umbilical cord blood and Transplantation.

Correspondence to: Denis Claude Roy  
Division of Hematology-Immunology  
Guy-Bernier Research Centre  
Hôpital Maisonneuve-Rosemont  
5415 L'Assomption Blvd.  
Montreal, QC, H1T 2M4, Canada  
Tel.: (514) 252-3404  
Fax: (514) 252-3430  
E-mail: denis-claude.roy@umontreal.ca

## Abstract

Patients that undergo bone marrow transplantation following myeloablative treatment usually develop severe and sometimes prolonged thrombo- and neutro-penia. One possible and currently intensely researched method to decrease the time to engraftment is *ex vivo* expansion of hematopoietic clonogenic progenitors using different cytokines or their combinations. In this study we tested the ability of PDFM, a mature porcine platelets extract, to support the *in vitro* expansion of hematopoietic progenitors. The culture of murine bone marrow cells in the presence of PDFM in serum-free medium for 2 days resulted in a significant 260% increase of megakaryocytic progenitors ( $p=0.018$ ). In order to enhance the effect of PDFM, we combined this product with stem cell factor (SCF) and thrombopoietin (TPO). *In vitro*, SCF significantly increased PDFM induced expansion of myeloid progenitors from 250% to 450%. In addition, PDFM prolonged the survival of megakaryocytic progenitors from umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> cells. In a mouse bone marrow transplantation model, the platelet level of irradiated mice transplanted with PDFM treated cells increased earlier than in mice that received fresh bone marrow ( $p=0.0023$ ). These results suggest that PDFM has the ability to induce *ex vivo* expansion of myeloid and particularly megakaryocytic hematopoietic progenitors and could have an impact on hematologic reconstitution.

*Abbreviations used in this paper* : HSC : Hematopoietic Stem Cell, SCT : Stem Cell Transplantation, MK : Megakaryocytes, PDFM : Platelet Derived Factor Mix, CB : Cord Blood.

## Introduction

Autologous stem cell transplantation (SCT), along with myeloablative treatments such as chemotherapy, is often used in the therapy of a wide variety of haematological and non haematological malignancies<sup>1</sup>. The major side effect of this procedure is severe cytopenia, which is characterised by decreased number of cells in the periphery<sup>2</sup>, including neutrophils, red blood cells and platelets and is a consequence of cytotoxic radio- or chemotherapy administered prior to the transplantation. Cytopenia is associated with increased risk of bleeding, anemia and decreased immune response. This condition is treated mainly with administration of G-CSF, GM-CSF<sup>3</sup> and blood transfusions. However, repeated transfusions are associated with increased frequency of viral and bacterial infections, alloimmunization and increased costs<sup>4,5</sup>. Thus, *ex vivo* expansion of hematopoietic progenitors has been intensely investigated with the goal of increasing the number and proliferative rate of hematopoietic stem cells prior to their infusion<sup>1</sup>. There are many clinical applications of this technique such as increasing the number of mature cells, increasing the number of progenitor cells and reducing the need for the large scale harvesting of bone marrow or multiple leukapheresis<sup>6-9</sup>.

The cytokines are regulators of hematopoietic homeostasis, modulating cell survival, proliferation and differentiation<sup>10</sup>. The identification and cloning of an increasing number of cytokines has enabled researchers to investigate their potential involvement in the regulation of hematopoiesis. Intensive research is focused on identifying a cytokine combination that would promote extensive hematopoietic progenitor cell expansion without decreasing the hematopoietic stem cell pool which is needed for long term hematopoietic reconstitution of the host<sup>11-14</sup>.

A number of hematopoietic growth factors were shown to have an effect on the megakaryocytic lineage, TPO being identified as the major regulator of MK proliferation and platelet production<sup>15-17</sup>. Moreover, combination of TPO, along with SCF and Flt-3L, has been shown to effectively support maintenance and expansion of HSC *in vivo*<sup>18,19</sup>.

TPO has been used in the context of *ex vivo* expansion, often in combination with other growth factors, and was shown to be an efficient promoter of MK progenitors.

One of the major disadvantages for using cytokines for HSC expansion is the lack of general availability for clinical use. Additionally, recombinant growth factors are exceedingly expensive considering the quantities needed for clinical transplantation. In this study, we evaluated the capability of a new compound, the Platelet Derived Factor Mix (PDFM), to promote the expansion of hematopoietic progenitors *in vitro*, particularly megakaryocytic progenitors. The PDFM is a lyophilised extract from porcine platelets obtained by osmotic lysis. The principal known components of PDFM are albumin, PDGF, fibronectin, thrombospondine and TGF- $\beta$ . The possible advantages of this product over recombinant cytokines are lower costs and the possibility of the extract to be obtained from autologous platelets, thereby eliminating the risk of allogeneic reactions.

Murine whole bone marrow and umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> cells were incubated with PDFM in different culture conditions in order to evaluate the potential of PDFM to induce the expansion of myeloid and megakaryocytic progenitors. *In vivo* bone marrow transplantation experiments were used to evaluate the effect of *ex vivo* expansion with PDFM on the hematologic reconstitution of irradiated mice. This study demonstrates that PDFM has an expansion potential on megakaryocytic progenitors and that the infusion of BM cells incubated with PDFM accelerated platelet recovery without compromising long-term reconstitution of the irradiated mice.



## Materials and Methods

**Mice.** Eight week old male C57BL/6J mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). A B6SJL mouse colony was expanded and maintained under pathogen-free conditions in the animal facility of the Guy-Bernier Research Center (Montreal, Canada). The mice were manipulated under laminar flow hood, housed in filter top cages and all manipulations were performed in accordance with institutional Animal Health Care Committee..

**Platelet Derived Factor Mix (PDFM).** PDFM is a mixture of growth factors extracted from highly purified porcine platelets by a method developed by scientists at Theratechnologies INC (Montreal, Canada). The growth factor rich supernatant was then recuperated after centrifugation of the platelet residues and resuspended in water. The composition of the PDFM was verified by HPLC and were consistent between the batches. The main components of the platelet extract were fibronectin (20.1  $\mu\text{g/ml}$ ), thrombospondin (17.4  $\mu\text{g/ml}$ ), PDGF (269 ng/ml), TGF- $\beta$ 1 (217 ng/ml) and albumin (0.4% of total proteins).

**Bone marrow cell preparation and short term culture conditions.** Bone marrow cells were flushed from the tibias and femurs of 8 to 12 weeks old C57BL/6J mice with Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 5% foetal bovine serum (Hyclone; Logan, UT, USA) and 1 U/ml heparin and used as total unfractionnated bone marrow cells. Cells were washed, counted, resuspended at a concentration of  $2 \times 10^6$  cells/ml and centrifuged twice at 800 g for 8 minutes in order to remove the mature platelets contained in the bone marrow. Cells were then seeded in 6-well plates at a concentration of  $1.5 \times 10^6$  cells/ml in IMDM media supplemented with 0.5% BSA (BSA; Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri), with 100 U/ml of Penicillin G Sodium, 100  $\mu\text{g/ml}$  of Streptomycine Sulfate (Pen Strep; GIBCO, Grand Island, New York), 2mM L-Glutamine (L-Glutamine; GIBCO, Grand Island, NY) and 5% Platelet Derived Factor Mix (PDFM; Celmed,

Montreal, Canada). Where indicated, other cytokines were also added to the liquid culture medium at previously determined concentrations: recombinant human TPO (rhTPO; Peprotech, Rocky Hill, NJ) and recombinant murine stem cell factor (rmSCF; Peprotech, Rocky Hill, NJ) at 100 ng/ml. For each condition of the liquid culture, cytopins were prepared at predetermined times using Cytospin 3 (Shandon;Pittsburg, PA) at 600 rpm for 7 minutes with a low acceleration. The slides are then dehydrated with methanol and stained with Wright Giemsa.

***CB cell preparation and purification of CD34<sup>+</sup> cells.*** CB samples were obtained at the end of full term deliveries from donors who gave informed consent at Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Canada. Samples were collected into sterile tubes containing EDTA anticoagulant. Blood samples were diluted 1:3 in Hank's balanced salt solution without Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY) before separation of Ficoll-Hypaque (density, 1.077 g/ml; Pharmacia Biotech; Uppsala, Sweden) density centrifugation. Low-density mononucleated cells (MNC) were separated, washed, and resuspended in cold PBS without Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> containing 0.1% BSA. CD34<sup>+</sup> cells were positively selected from mononuclear cells obtained by Ficoll-Hypaque using magnetic cell sorting (Dyna; Lake Success, NY) following the manufacturer's recommendation. The efficiency of purification, as verified by flow cytometry counterstaining with an anti-human CD34 antibody conjugated with phyco-erythrin (CD34 PE; Immunotech; Emeryville, CA) was consistently more than 85%.

***CB CD34<sup>+</sup> cell expansion.*** CD34<sup>+</sup> cells were resuspended in 24 well plates at a concentration of  $5 \times 10^4$  cells/ml in X-VIVO 15 (SERVA, Heidelberg, Germany) supplemented with 0.5% BSA, 100 U/ml of Penicillin G Sodium, 100 µg/ml of Streptomycin Sulfate and 2mM L-Glutamine. RhTPO was added at a concentration of 100 ng/ml.

***Colony-forming cell assay.*** Unseparated murine bone marrow cells from the liquid culture were harvested after 0, 2, 4 and 6 days and plated in 35-mm petri dishes (Sarstedt; Montreal, Canada) ( $10^4$  to  $2 \times 10^4$  cells per dish) in 1.1 ml of Methocult M3434 (Stem

Cell Technologies, Vancouver, Canada) containing 3 U/ml recombinant human Epo, 10 ng/ml recombinant human IL-6, 50 ng/ml recombinant murine SCF and 10 ng/ml recombinant murine IL-3. Human CB CD34<sup>+</sup> cells from the liquid culture were plated ( $1 \times 10^3$  to  $2 \times 10^4$  cells per dish) in 1.1 ml of Methocult M4434 (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) containing recombinant human SCF (50 ng/ml), GM-CSF (10 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml) and Epo (3 U/ml). All semi-solid cultures were initiated in duplicates, incubated at 37°C in a fully humidified environment with 5% CO<sub>2</sub>, and were then scored after 8-10 days for the murine assay and after 14-16 days for human assay.

***Colony-forming units megakaryocyte (MK) assay.*** Murine bone marrow cells from the liquid culture were plated ( $5 \times 10^4$  to  $1 \times 10^5$  cells per slide) in duplicates after 0, 2, 4 and 6 days in 0.85 ml collagen-based serum-free medium Megacult-C #04960 (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) in double chamber slides. Recombinant murine IL-3 (10 ng/ml), recombinant human TPO (50 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml) and IL-11 (50 ng/ml) (Peprotech; Rocky Hill, NJ) and bovine collagen solution were added to the media. Slides were incubated for 6 days at 37°C in a fully humidified environment with 5% CO<sub>2</sub> and were then dehydrated in acetone. Megakaryocytes were stained for acetylcholinesterase activity according to manufacturer's instruction and scored. Human CB CD34<sup>+</sup> cells from the liquid culture were plated ( $1 \times 10^3$  to  $1 \times 10^5$  cells per slide) in 0.85 ml Megacult-C medium #04961 containing rhTPO (50 ng/ml), rhIL-6 (10 ng/ml) and rhIL-3 (10 ng/ml) (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada). The slides were incubated for a period of 10 to 12 days, after which period the slides were fixed in a acetone:methanol solution and megakaryocyte colonies were detected by immunocytochemical staining with GPIIb/IIIa according to manufacturer's protocol.

***Bone marrow transplantation.*** C57BL/6J (Ly5.2) recipient mice were lethally irradiated with 8.5 Gy from a <sup>60</sup>Co source at a dose rate of 128 cGy/minute on the day of transplantation. The mice were given intra peritoneal injections of physiologic solution during five days and had a prophylactic tetracycline treatment for 21 days after the irradiation. Bone marrow cells obtained from B6SJL (Ly5.1) mice were cultured in IMDM with 0.5% BSA, 100 U/ml of Penicillin G Sodium, 100 µg/ml of Streptomycin

Sulfate, 2mM L-Glutamine and with or without 5% PDFM at a concentration of  $1.5 \times 10^6$  cells/ml. Where indicated, 50 ng/ml of TPO or SCF were added to the liquid culture. Cells were harvested after 48 hours, washed and resuspended at a concentration of  $2.5 \times 10^6$  cells/ml in RPMI supplemented with 100 U/ml of Penicillin G Sodium, 100  $\mu$ g/ml of Streptomycin Sulfate and  $0.5 \times 10^6$  cells were injected via the lateral vein in a volume of 0.2 ml. Peripheral blood samples were collected starting from day 6 after the BMT at 2-3 days interval for Wright-Giemsa staining and differential counts. using heparinised capillaries, transferred into capped tubes containing EDTA. The samples were then processed by the Coulter Micro Diff II to obtain platelet, white and red blood cell counts.

***Statistical analysis :*** Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM where applicable.

## Results

### *PDFM expands the megakaryocytes in unfractionated murine bone marrow*

To determine the effect of PDFM on hematopoietic progenitors, unfractionated murine bone marrow was cultured in the presence or absence of 5% PDFM (v/v). In the culture media supplemented with PDFM the total number of cells was increased by  $1.23 \pm 0.02$  fold after 2 days (Figure 1 a). In addition, a  $2.6 \pm 0.32$  fold increase in the number of MK colonies ( $p=0.018$ ) and a  $1.42 \pm 0.26$  increase in the number of Mix MK colonies ( $p=0.04$ ) compared to the control was detected (Figure 1 f and g). Moreover, myeloid progenitors were maintained better in the presence of 5% PDFM than in the control culture (Figure 1, panels c, d and e). A lower concentration of PDFM (0.625%) could also support a modest ( $1.32 \pm 0.27$  fold) expansion of the MK progenitors after 2 days of liquid culture (Figure 1 f). However, the number of all myeloid progenitors decreased at a rate comparable to the control culture. Therefore, we decided to use 5% PDFM in all subsequent experiments.

### *FBS diminishes the expansion potential of PDFM on megakaryocytes*

To further determine the most optimal conditions for the culture of the fresh bone marrow cells in the presence of PDFM, 10% foetal bovine serum (FBS) was added to the liquid culture media. The addition of 10% FBS alone did not affect the total cell number in liquid culture (Figure 2 a). However, the presence of 10% FBS and 5% PDFM increased total cell number by  $1.47 \pm 0.127$  and  $2.64 \pm 0.09$  fold after 2 and 4 days of culture, respectively. The combination of PDFM and FBS also increased the number of CFU-G by 1.51 fold and CFU-M by  $2.03 \pm 0.19$  fold after 4 days of liquid culture (Figure 2 c and d). However, the number of MK progenitors generated during the *ex vivo* expansion was lower in the presence of FBS (Figure 2 f). While the number of MK progenitors in presence of 5% PDFM alone increased by  $2.25 \pm 0.34$  fold the addition of 10% FBS significantly decreased the expansion to  $1.27 \pm 0.23$  fold ( $p = 0.031$ ). Because our initial

goal was to expand MK progenitors, we decided not to add FBS to the liquid culture media for the subsequent experiments.

#### *Synergistic effect of PDFM and SCF on murine bone marrow cells*

Since Stem Cell Factor (Steel Factor, SCF) is known to enhance the survival of hematopoietic cells, we decided to determine if its addition to the PDFM supplemented liquid culture media will result in increased expansion of HSC. Addition of 100 ng/ml of SCF, in combination with PDFM, led to an increased maintenance of the cells in the liquid culture compared to PDFM alone (Figure 3 a). After 2 days the number of cells has increased by  $1.37 \pm 0.098$  fold, and this was maintained until day 6 ( $1.16 \pm 0.25$ ). The total number of cells obtained after the addition of SCF and PDFM is higher than the one obtained with PDFM alone. The combination of SCF and 5% PDFM was most beneficial for myeloid progenitors. Specifically, by day 6, the expansion for CFU-GM was 2.33 fold, for CFU-G it was 4.37 fold, for CFU-M 3.53 fold and 2.7 fold for CFU-GEMM (Figure 3 b, c, d, and e). However, the addition of SCF did not result in expansion of MK progenitors, moreover it abrogated the PDFM mediated expansion (Figure 3 f), but it did preserve them until day 6 of the culture at  $80 \pm 49\%$  of their initial number. This was comparable to SCF alone, which maintained the MK progenitors up until day 6 but did not promote their expansion. The Mix Mk progenitors, were expanded to 1.5 fold after 2 days of culture with SCF alone and the addition of PDFM did not have any major effect (Figure 3 g). These results suggest that SCF and PDFM combination act synergistically to specifically expand myeloid progenitors, while the addition of SCF abrogates the effect of PDFM on MK progenitors.

#### *Synergistic effect of PDFM and TPO on murine bone marrow cells*

Since TPO is well known for its ability to support MK and other hematopoietic progenitors, we tested the combination of PDFM with 100 ng/ml of TPO for the effect on murine bone marrow *in vitro*. The effect of TPO alone on the total number of cells in the liquid culture was comparable to that of the control media which does not contain any

growth factors (Figure 4 a). The same result was obtained with the media supplemented with TPO and 5% PDFM. Results obtained for the myeloid progenitors in the presence of TPO were also comparable to those observed with the control media (Figure 4 b, c, d, and e). The presence of both TPO and PDFM, delayed the decrease in the number of progenitors for 2 days. Surprisingly, there was no expansion of MK or Mix MK progenitors in presence of TPO alone, only a short delay in the drop of their (Figure 4 f and g). However, in the presence of TPO and PDFM we observed a 2.41 fold expansion of MK progenitors and a 2.02 fold expansion of Mix MK progenitors after 2 days of culture. Since this expansion is comparable to the one obtained with PDFM alone the results suggest that, in the culture conditions tested, the addition of TPO has no effect on PDFM generated expansion of MK progenitors.

*PDFM maintains erythroid, myeloid and megakaryocytic progenitors in short term umbilical cord blood (UCB) CD34<sup>+</sup> cell culture*

The use of UCB as a source of HSC for transplantation is becoming increasingly frequent. We decided to test if a short term culture of CD34<sup>+</sup> UCB derived cells with PDFM may increase the frequency of hematopoietic progenitors in the UCB sample. The CD34<sup>+</sup> cells, positively selected from UCB and cultured in X-Vivo-15 media supplemented with PDFM and/or TPO. The addition of 5% PDFM to the liquid culture media maintained the total number of cells significantly better compared to the control media until the end of observation period ( $p=0.0049$ , Figure 5 a). When TPO alone was added to the media, the total number of cells was significantly higher than the control, maintaining  $76 \pm 16.4\%$  of the initial number of cells after 4 days ( $p=0.031$ ) a maintenance at  $106 \pm 32\%$  ( $p=0.0434$ ) after 6 days of culture compared to a decrease to  $23 \pm 2.5\%$  and  $13 \pm 2.7\%$  of the input for the control, respectively. However, the difference observed between the values obtained with 5% PDFM alone and TPO alone were not statistically significant. In addition, while the combination of 5% PDFM and 50 ng/ml TPO also resulted in maintenance of the total number of cells the effect was similar to the one observed with 5% PDFM alone. We also evaluated the erythroid progenitors that were present in the liquid culture during the culture period. The addition of 5%

PDFM generated a significantly higher maintenance of the BFU-E ( $61 \pm 2.1\%$ ,  $41 \pm 13.8\%$  and  $37.4 \pm 8.7\%$  after 2, 4 and 6 days, respectively) compared to the control ( $31 \pm 3.2\%$ ,  $6 \pm 1.2\%$  and  $1 \pm 0.22\%$ , for the same observation periods) (Figure 5 b). Interestingly, we also observed a good maintenance, of the BFU-E progenitors in the presence of TPO ( $94 \pm 22\%$ ,  $102 \pm 13\%$  and  $131 \pm 49\%$  after 2, 4 and 6 days, respectively) which is significant when compared to the control, but only significant on day 4 ( $p=0.0018$ ) when compared with the values obtained with 5% PDFM. The combination of PDFM and TPO did not have significantly different effect to that of PDFM alone. The results obtained for the CFU-GM and the CFU-GEMM progenitors were similar (Figure 5 c and d). We observed that PDFM significantly enhanced the maintenance level of CFU-GM ( $70 \pm 12.2$ ,  $37 \pm 11.6\%$  and  $36 \pm 7.1\%$  after 2, 4 and 6 days of liquid culture) and CFU-GEMM ( $63 \pm 7.7\%$ ,  $45 \pm 20.6\%$  and  $48 \pm 14.2\%$  after 2, 4 and 6 days of liquid culture,  $p = 0.027$  and  $p = 0.0098$  after 4 and 6 days for CFU-GM and  $p = 0.029$  and  $p = 0.031$  after 2 and 6 days for CFU-GEMM) compared to the control culture. The presence of TPO alone also enhanced the maintenance of the CFU-GM and CFU-GEMM but at levels which were not significantly different from those obtained with PDFM. The combination of PDFM and TPO did enhance the maintenance of CFU-GM and CFU-GEMM, however the values were not significantly different from those obtained with PDFM alone. The addition of PDFM had a significant maintenance effect on the MK levels compared to the control culture (Figure 5 e). While MK numbers dropped abruptly after 2 days ( $34 \pm 9.9\%$  of the initial progenitor level) in the control culture, the addition of 5% PDFM kept the MK progenitors at levels close to the initial value for the entire evaluation time ( $93 \pm 18.4\%$ ,  $108 \pm 18\%$  and  $102 \pm 26\%$  after 2, 4 and 6 days ( $p=0.041$ ,  $p=0.009$  and  $p=0.032$  respectively). Similarly, the presence of TPO generated significantly higher numbers of MK compared to the control ( $p = 0.04$ ,  $p=0.014$  and  $p=0.018$  after 2, 4 and 6 days), however the difference to the numbers obtained for PDFM supplemented culture was not statistically significant. Similar results were obtained for Mix MK progenitors for all three culture conditions (Figure 5 f). The combination of PDFM and TPO on MK and Mix MK progenitors was similar to that obtained by PDFM alone. The results suggest that while PDFM did enhance maintenance of UCB derived hematopoietic progenitors, its effect was not as pronounced as that of



TPO. In addition, while combination of TPO and PDFM was somewhat better maintaining progenitors than PDFM alone, its effect was less compared to TPO alone.

*Shorter platelet recovery after BMT of ex vivo expanded bone marrow cells with PDFM*

The goal of this study was to evaluate if PDFM could be used for *in vitro* manipulation of HSC to accelerate the rate of hematopoietic reconstitution by the administration of an *ex vivo* manipulated graft. The bone marrow was cultured for two days in serum-free media supplemented with different growth factors (PDFM, TPO and SCF) and  $0.5 \times 10^6$  cells were injected in lethally irradiated (850 cGy) C57BL/6J mice. Starting at day 6 post BMT, blood was collected from the transplanted mice every 2 to 3 days and differential cell counts were performed. We compared the hematopoietic recovery of the mice that received a treated graft to that of the mice which received fresh bone marrow in order to determine if with the exposure of BM to PDFM we accelerated the recovery of the different hematopoietic cell lineages. The leukocytes, neutrophils, erythrocytes and platelets were evaluated at each time point. The mice which received fresh BM had their platelet nadir 12 days post transplant and then recovered  $> 2 \times 10^{11}$  platelets /L after 15 days (Figure 6 a and b). Similarly, mice which received a graft treated with 5% PDFM also recovered their platelet count to  $> 2 \times 10^{11}$  /L after 15 days. However, their platelet nadir occurred at day 9 (compared to day 12 for the control) and their platelet level at day 12 was 3.6 times higher than that of the mice which received a fresh BM graft ( $p=0.0023$ ) and 1.7 times higher than in the mice that received TPO expanded graft ( $p=0.003$ ). Similarly, neutrophil counts of mice which received PDFM treated bone marrow recovered more quickly to the threshold of  $> 2 \times 10^9$  compared to the mice transplanted with fresh bone marrow (18 days for PDFM group, vs. 23 days for fresh BM group) however, the difference was not statistically significant (Figure 7 a and b). . Since the red blood cell count did not drop below  $4.7 \times 10^{12}$  erythrocytes/L, there was no significant difference in the RBC recovery between the groups (Figure 7 a and b). These results show that PDFM preserves the precursor cells needed for the hematopoietic reconstitution of irradiated mice.

## Discussion

The *ex vivo* expansion potential of PDFM, a cytokine cocktail obtained by the lyophilisation of porcine platelets, was evaluated in this study. We hypothesised that PDFM may have a mitogen effect on HSC since it is known that platelets contain diverse growth factors that can regulate their own production and act on the regulation of other cell types<sup>20,21</sup>.

In a serum-free environment, a 5% v/v concentration of PDFM significantly increased the number of the MK progenitors from murine BM, resulting in a 2.6-fold expansion after 2 days of culture ( $p=0.018$ ) (Figure 1 f). In addition, we observed better maintenance of the myeloid progenitors in the culture supplemented with PDFM compared to control. This indicates that there are active components in this product supporting *ex vivo* expansion of MK progenitors. The analysis of PDFM<sup>22</sup> demonstrated the presence of PDGF among other cytokines present in the mix. PDGF is a growth factor known to be a major mitogen for connective tissue cells. In addition, it is also implicated in the regulation of erythroid and megakaryocytic lineage cells<sup>23,24</sup>. Yang et al. showed that PDGF has a significant stimulating effect on CFU-MK<sup>25</sup>. The expansion of MK progenitors observed in our experiments could therefore be explained in part as the effect of PDGF present in PDFM.

Since we observed only maintenance of myeloid progenitors in previous experiments, we modified the culture conditions by adding 10% FBS. When compared to serum-free culture, an increased expansion of myeloid progenitors and an increase in total number of cells was observed with the addition of PDFM. However, the addition of serum was detrimental to the MK progenitors since it abrogated the expansion observed with PDFM in serum-free media (Figure 2 f). This is in agreement with several observations that the presence of platelet-reaction derived TGF- $\beta$  in serum was a potent inhibitor of MK progenitors<sup>26-28</sup>. Since our main goal was MK expansion, we opted for a serum free media in all our subsequent experiments.

In the culture conditions tested, the addition of PDFM resulted in expansion of MK progenitors only. While the presence of 10% FBS did result in a limited expansion of myeloid progenitors, it had an inhibitory effect on MK lineage. Thus, we decided to supplement our growth media with SCF, a cytokine shown to affect proliferation and differentiation of primitive progenitors<sup>17</sup>. When used alone, SCF has been shown to transiently maintain the long term repopulating ability of very early hematopoietic stem cells<sup>29</sup>. Its addition to a combination of growth factor significantly increased expansion activity of the culture on early hematopoietic progenitors and colony forming cells<sup>30,31</sup>. The results presented in figure 3 (b, c, d, e) show that the combination of 100 ng/ml SCF and 5% PDFM resulted in an expansion of myeloid progenitors compared to either media alone or PDFM alone, however these differences were not statistically significant. As with the addition of serum, the presence of SCF abrogated PDFM mediated expansion of MK progenitors and the presence of 5% PDFM alone remained the best culture condition for this lineage. The decrease of the MK expansion in the concomitant presence of PDFM and SCF could be explained by a massive expansion of myeloid progenitors. This cytokine combination seems to favour myeloid output from CFU-GEMM progenitors with the net result of decreased megakaryocytic output.

TPO is known that TPO plays a pivotal role in the regulation of megakaryopoiesis and in the regulation of hematopoiesis in general<sup>17</sup>. It was shown to promote the proliferation and differentiation of immature MK<sup>32,33</sup>. Most of the time, TPO, like SCF, is used in combination with other growth factors, such as IL-3, with which it was shown to have a great synergistic activity<sup>34</sup>. In our short term culture, TPO did not seem to have any effect on myeloid and MK progenitors of murine BM (Figure 4). Moreover, the combination of TPO and PDFM did not act in a synergistic manner. TPO may have a more long term effect on MK progenitors, which could not be detected with our experimental setting of short term culture<sup>35</sup>.

It is known that the source of HSC is an important parameter in *ex vivo* expansion. Umbilical cord blood (UCB) has been shown to be a great source HSC<sup>13,36</sup> and its use in clinical settings is rapidly increasing<sup>37</sup>. However, the amount of cells obtained from a

single donor is usually not enough to engraft an adult, therefore the *ex vivo* expansion of these cells is becoming a focus of increasingly intensive research<sup>38</sup>. We evaluated the expansion of UCB derived CD34<sup>+</sup> cells in the presence of PDFM in order to determine its effect on a selected population of HSC. While the effect of PDFM on UCB derived CD34<sup>+</sup> cell varied with the lineage it can be generally described as increased maintenance compared to the control. Erythroid and myeloid progenitors were maintained at approximately 50% after 6 days of culture which was significantly better compared to the cells cultured in X-Vivo 15 alone ( $p < 0.05$ ) (Figure 5 b, c and d). Additionally, the number of MK progenitors was maintained at 100% relative to their starting number for the duration of the culture (Figure 5 e). The presence of TPO increased the absolute number of myeloid, erythroid and MK progenitors, but the difference with the effect of PDFM was not significant ( $p > 0.05$ ).

Interestingly, the combination of PDFM and TPO was less effective in maintaining the UCB derived progenitor cells in the culture compared to TPO alone. One possible explanation for this observation may be that TPO increases the number of TGF- $\beta$  I and II receptors on MK<sup>39</sup>. It is known that PDFM contains TGF- $\beta$ <sup>22</sup> and that the TPO mediated increase in TGF- $\beta$  receptors renders MK susceptible to the negative regulation by PDFM derived TGF- $\beta$  thus negating any mitogenic or survival signals mediated by other components of the product..

The expansion of MK progenitors was significantly more pronounced with BM as a cell source compared to a CD34<sup>+</sup> selected population ( $p = 0.063$ ). It was observed that PDGF, present in PDFM, may affect hematopoietic cells directly or by inducing release of growth factors from connective tissue cells present in the BM harvest<sup>25,40</sup>. Thus the MK progenitors present in the culture environment of non-fractionated BM harvest may be more responsive to the mitogenic or survival effect of PDFM compared to cells in the culture devoid of any non-hematopoietic contaminants.

The goal of this study was to determine if *in vitro* treatment of HSC with PDFM could be used to decrease the cytopenia period following stem cell transplantation after

myeloablative therapy. We verified the neutrophils, the white blood cells and the red blood cells in the peripheral blood of these mice. The only variation seen was in the mice treated with SCF and PDFM, which displayed lower levels of neutrophils up until 30 days post BMT (Figure 7 b). Since we saw in the *in vitro* assay that this growth factor combination increased the number of myeloid colonies, we may have exhausted these progenitors by pushing them into differentiation too early. As for the white blood cells (Figure 7 c and d) and the red blood cells (Figure 6 c and d), their levels are comparable between fresh BM and PDFM treated bone marrow, showing that there was no alteration of the repopulating potential of the *ex vivo* expanded graft. Finally, the platelets levels of PDFM treated mice seem to increase earlier than fresh BM (Figure 6 a and b). In fact, at day 12, the level of platelet of these mice is significantly higher than those who received fresh BM ( $p=0.0023$ ). We compared our results to those obtained by Szilvassy et al.<sup>41</sup>, the threshold of platelets to obtain is 20% of the normal amount of platelets in mice ( $200 \times 10^9 /L$ ). We saw that this threshold was obtained after 15 days for both groups of mice (fresh and PDFM treated BM), as they saw in their study. The increase of the platelet level was seen 3 days earlier in the PDFM treated group. Moreover, it is important to mention that at day 12 post BMT, the level of platelets is significantly higher in PDFM treated mice than in the TPO treated mice ( $p=0.003$ ).

So, even if we were not able to significantly increase the platelet levels in the mice receiving PDFM treated grafts, we can see that a 2 days incubation of the BM with this compound kept the graft in a state comparable to fresh bone marrow. It was shown in a study by Sitnicka et al. that TGF- $\beta$  would directly inhibit the proliferation of LTR-HSC contained in a HSC rich population<sup>42</sup>. The time required for their first division was prolonged. They say that TGF- $\beta$  would be responsible for the maintenance of high proliferative potential-colony forming cells during up to 8 days in culture. So this component which inhibits MK and MK progenitors proliferation *in vitro* could have a beneficial role for the long term repopulating cells.

## Figure Legends

**Figure 1. Effect of different concentrations of PDFM on total cell number and progenitors of murine BM.** Fresh BM was obtained from healthy C57BL/6J mice and cultured in serum-free media at  $1.5 \times 10^6$  cells/ml. Different doses of PDFM were added to the culture media : no PDFM (✕), 5% PDFM (▲) and 0.625% PDFM (—). Total cell counts and semi-solid assays were performed after 0, 2, 4 and 6 days of culture. Panel a) represents the total number of live cells in culture. Panel b), c), d) and e) show myeloid progenitors (CFU-GM, CFU-G, CFU-M and CFU-GEMM). Panel f) and g) represents megakaryocytic progenitors (CFU-MK and Mix MK). The presence of 5% PDFM induces a 260% increase of MK progenitors ( $p=0.018$ ). Results are expressed as a mean  $\pm$  SD of 3 experiments.

**Figure 2 : The presence of FBS diminishes the expansion potential of PDFM.** Fresh bone marrow cells were prepared and were cultured in liquid media containing or not 10% FBS. The different conditions of culture were: media (✕), 5% PDFM(▲), 10% FBS(◆) and PDFM + 10% FBS (▲). Panel a) represents the total number of live cells in culture. Panel b), c), d) and e) show myeloid progenitors (CFU-GM, CFU-G, CFU-M and CFU-GEMM). Panel f) and g) represents megakaryocytic progenitors (CFU-MK and Mix MK). The presence of FBS has a beneficial effect on certain myeloid progenitors but it decreases the expansion of MK progenitors observed in serum free media. Results are expressed as a mean  $\pm$  SD of 3 experiments.

**Figure 3. The combination of SCF and PDFM promoted a greater expansion of myeloid progenitors.** Fresh bone marrow cells were prepared and were cultured in liquid media and cultures in media containing or not PDFM and SCF. The different conditions of culture were: media (✕), 5% PDFM(▲), 100 ng/ml SCF(■) and PDFM + SCF (■). Panel a) represents the total number of live cells in culture. Panel b), c), d) and e) show myeloid progenitors (CFU-GM, CFU-G, CFU-M and CFU-GEMM). Panel f) and g) represents megakaryocytic progenitors (CFU-MK and Mix MK). The combination of SCF and PDFM shows an increased expansion of myeloid progenitors by has no

significant effect on MK progenitors. Results are expressed as a mean  $\pm$  SD of 3 experiments.

**Figure 4. The combination of TPO and shows no synergistic or additive effect on myeloid and MK progenitors.** Fresh bone marrow cells were prepared and were cultured in liquid media and cultures in media containing or not PDFM and SCF. The different conditions of culture were: media (X), 5% PDFM( $\blacktriangle$ ), 100 ng/ml TPO( $\bullet$ ) and PDFM + TPO ( $\bullet$ ). Panel a) represents the total number of live cells in culture. Panel b), c), d) and e) show myeloid progenitors (CFU-GM, CFU-G, CFU-M and CFU-GEMM). Panel f) and g) represents megakaryocytic progenitors (CFU-MK and Mix MK). The combination of TPO and PDFM shows results comparable to the results obtained with PDFM alone. No additive or synergistic effect were observed. Results are expressed as a mean  $\pm$  SD of 2 experiments.

**Figure 5. PDFM maintains completely MK progenitors of CD34+ cord blood cells.**

CD34+ cells from umbilical CB were positively selected with magnetic beads and put in culture at a concentration of  $0.05 \times 10^6$  cells/ml. The different conditions of culture were: media (X), 5% PDFM( $\blacktriangle$ ), 100 ng/ml TPO( $\bullet$ ) and PDFM + TPO ( $\bullet$ ). Panel a) represents the total number of live cells in culture. Panel b), c), and d) show, respectively, BFU-E, CFU-GM, and CFU-GEMM. Panel e) and f) represents megakaryocytic progenitors (CFU-MK and Mix MK). PDFM induces the total maintenance of CFU-MK for at least 6 days. The combination of TPO and PDFM diminish the potential of expansion of TPO alone. Results are expressed as a mean  $\pm$  SD of 5 experiments.

**Figure 6. The transplantation of *ex vivo* expanded bone marrow with PDFM accelerates platelet recovery in irradiated mice.** Bone marrow cells from B6SJL mice was incubated 2 days with PDFM, SCF, TPO and the combination of these growth factors. Irradiated C57BL/6J mice (1000 rad) received  $0.5 \times 10^6$  fresh or expanded cells and their hematologic recovery was monitored starting on day 6 post BMT. Panels a) and b) represent platelet recovery and panels c) and d) represent white blood cell recovery.

The different culture condition are represented : Fresh BM (◆), 5% PDFM(▲), 100 ng/ml TPO(●), PDFM + TPO, (● ) 100 ng/ml SCF(■ ) and PDFM + SCF (■ ). Results show that the platelet level from the mice injected with PDFM treated cells increased 3 days earlier than the mice which received a fresh graft ( $p=0.0023$ ) or a TPO treated graft ( $p=0.003$ ).

**Figure 7. The combination of PDFM and SCF induces a delayed neutrophil engraftment in the irradiated mice.** Bone marrow cells from B6SJL mice was incubated 2 days with PDFM, SCF, TPO and the combination of these growth factors. Irradiated C57BL/6J mice (1000 rad) received  $0.5 \times 10^6$  fresh or expanded cells and their hematologic recovery was monitored starting on day 6 post BMT. Panels a) and b) represent neutrophil recovery and panels c) and d) represent white blood cell recovery. Fresh BM (◆), 5% PDFM(▲), 100 ng/ml TPO(●), PDFM + TPO(● ), 100 ng/ml SCF (■ ) and PDFM + SCF (■ ). The mice receiving a graft expanded with both PDFM and SCF saw their neutrophil recovery delayed until a minimum of 36 days. Mice receiving a fresh graft or a graft expanded with PDFM saw their platelet reach  $2 \times 10^9/L$  after, respectively, 23 and 18 days.



## Reference List

- (1) Emerson SG. Ex vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: the next generation of cellular therapeutics. *Blood*. 1996;87:3082-3088.
- (2) Devine SM, Adkins DR, Khoury H et al. Recent advances in allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *J Lab Clin Med*. 2003;141:7-32.
- (3) Clarke K, Basser RL. The role of platelet growth factors in cancer therapy. *Stem Cells*. 1996;14 Suppl 1:274-280.
- (4) Kuter DJ, Begley CG. Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies. *Blood*. 2002;100:3457-3469.
- (5) McCullough J. Current issues with platelet transfusion in patients with cancer. *Semin Hematol*. 2000;37:3-10.
- (6) Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol*. 2001;2:172-180.
- (7) McNiece I, Briddell R. Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells and mature cells. *Exp Hematol*. 2001;29:3-11.
- (8) Murdoch B, Chadwick K, Martin M et al. Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:3422-3427.
- (9) Reya T, Duncan AW, Ailles L et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003;423:409-414.
- (10) Dempke W, Von Poblozki A, Grothey A, Schmoll HJ. Human hematopoietic growth factors: old lessons and new perspectives. *Anticancer Res*. 2000;20:5155-5164.
- (11) Gammaitoni L, Bruno S, Sanavio F et al. Ex vivo expansion of human adult stem cells capable of primary and secondary hemopoietic reconstitution. *Exp Hematol*. 2003;31:261-270.
- (12) Peters SO, Kittler EL, Ramshaw HS, Quesenberry PJ. Ex vivo expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood*. 1996;87:30-37.
- (13) Piacibello W, Sanavio F, Garetto L et al. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood*. 1997;89:2644-2653.
- (14) Rice AM, Wood JA, Milross CG et al. Prolonged ex vivo culture of cord blood CD34(+) cells facilitates myeloid and megakaryocytic engraftment in the non-obese diabetic severe combined immunodeficient mouse model. *Br J Haematol*. 2001;114:433-443.
- (15) Kato T, Matsumoto A, Ogami K et al. Native thrombopoietin: structure and function. *Stem Cells*. 1998;16 Suppl 2:11-19.
- (16) Kaushansky K. Thrombopoietin and hematopoietic stem cell development. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;872:314-319.
- (17) Verfaillie CM. Optimizing hematopoietic stem cell engraftment: a novel role for thrombopoietin. *J Clin Invest*. 2002;110:303-304.

- (18) Borge OJ, Ramsfjell V, Cui L, Jacobsen SE. Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34+. *Blood*. 1997;90:2282-2292.
- (19) Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H et al. c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood*. 2001;97:139-146.
- (20) Sungaran R, Chisholm OT, Markovic B et al. The role of platelet alpha-granular proteins in the regulation of thrombopoietin messenger RNA expression in human bone marrow stromal cells. *Blood*. 2000;95:3094-3101.
- (21) Vassbotn FS, Havnen OK, Heldin CH, Holmsen H. Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor. *J Biol Chem*. 1994;269:13874-13879.
- (22) Beauger N. Manipulation *ex vivo* de greffons pour éliminer les cellules malignes et favoriser l'expansion des cellules souches hématopoïétiques normales. Université de Montréal, 2001.
- (23) Dainiak N, Davies G, Kalmanti M, Lawler J, Kulkarni V. Platelet-derived growth factor promotes proliferation of erythropoietic progenitor cells in vitro. *J Clin Invest*. 1983;71:1206-1214.
- (24) Komatsu N, Suda T, Sakata Y et al. Megakaryocytopoiesis in vitro of patients with essential thrombocythaemia: effect of plasma and serum on megakaryocytic colony formation. *Br J Haematol*. 1986;64:241-252.
- (25) Yang M, Chesterman CN, Chong BH. Recombinant PDGF enhances megakaryocytopoiesis in vitro. *Br J Haematol*. 1995;91:285-289.
- (26) Berthier R, Valiron O, Schweitzer A, Marguerie G. Serum-free medium allows the optimal growth of human megakaryocyte progenitors compared with human plasma supplemented cultures: role of TGF beta. *Stem Cells*. 1993;11:120-129.
- (27) Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*. 2000;96:2022-2036.
- (28) Lefebvre P, Winter JN, Kahn LE, Giri JG, Cohen I. Megakaryocyte ex vivo expansion potential of three hematopoietic sources in serum and serum-free medium. *J Hematother*. 1999;8:199-208.
- (29) Li CL, Johnson GR. Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. *Blood*. 1994;84:408-414.
- (30) Kobari L, Pflumio F, Giarratana M et al. In vitro and in vivo evidence for the long-term multilineage (myeloid, B, NK, and T) reconstitution capacity of ex vivo expanded human CD34(+) cord blood cells. *Exp Hematol*. 2000;28:1470-1480.
- (31) Ueda T, Tsuji K, Yoshino H et al. Expansion of human NOD/SCID-repopulation cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *Journal of clinical investigation*. 2000;105:1013-1021.
- (32) Sitnicka E, Lin N, Priestley GV et al. The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood*. 1996;87:4998-5005.
- (33) Kaushansky K, Lok S, Holly RD et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature*. 1994;369:568-571.

- (34) Kobayashi M, Laver JH, Kato T, Miyazaki H, Ogawa M. Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cells in synergy with steel factor and/or interleukin-3. *Blood*. 1996;88:429-436.
- (35) Yagi M, Ritchie KA, Sitnicka E et al. Sustained ex vivo expansion of hematopoietic stem cells mediated by thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8126-8131.
- (36) Holyoake TL, Nicolini FE, Eaves CJ. Functional differences between transplantable human hematopoietic stem cells from fetal liver, cord blood, and adult marrow. *Exp Hematol*. 1999;27:1418-1427.
- (37) Jaroscak J, Goltry K, Smith A et al. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell System. *Blood*. 2003;101:5061-5067.
- (38) Pick M, Eldor A, Grisaru D et al. Ex vivo expansion of megakaryocyte progenitors from cryopreserved umbilical cord blood. A potential source of megakaryocytes for transplantation. *Exp Hematol*. 2002;30:1079.
- (39) Sakamaki S, Hirayama Y, Matsunaga T et al. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) induces thrombopoietin from bone marrow stromal cells, which stimulates the expression of TGF-beta receptor on megakaryocytes and, in turn, renders them susceptible to suppression by TGF-beta itself with high specificity. *Blood*. 1999;94:1961-1970.
- (40) Su RJ, Li K., Yang M., C.M.Y. Chiu, and P.M.P Yuen. Effects of platelet derived growth factor on the ex vivo expansion of cord blood CD34+ cells [abstract]. *Exp Hematol*. 2000;28:1491-1505.
- (41) Szilvassy SJ, Weller KP, Chen B et al. Partially differentiated ex vivo expanded cells accelerate hematologic recovery in myeloablated mice transplanted with highly enriched long-term repopulating stem cells. *Blood*. 1996;88:3642-3653.
- (42) Sitnicka E, Ruscetti FW, Priestley GV, Wolf NS, Bartelmez SH. Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood*. 1996;88:82-88.

Figure 1

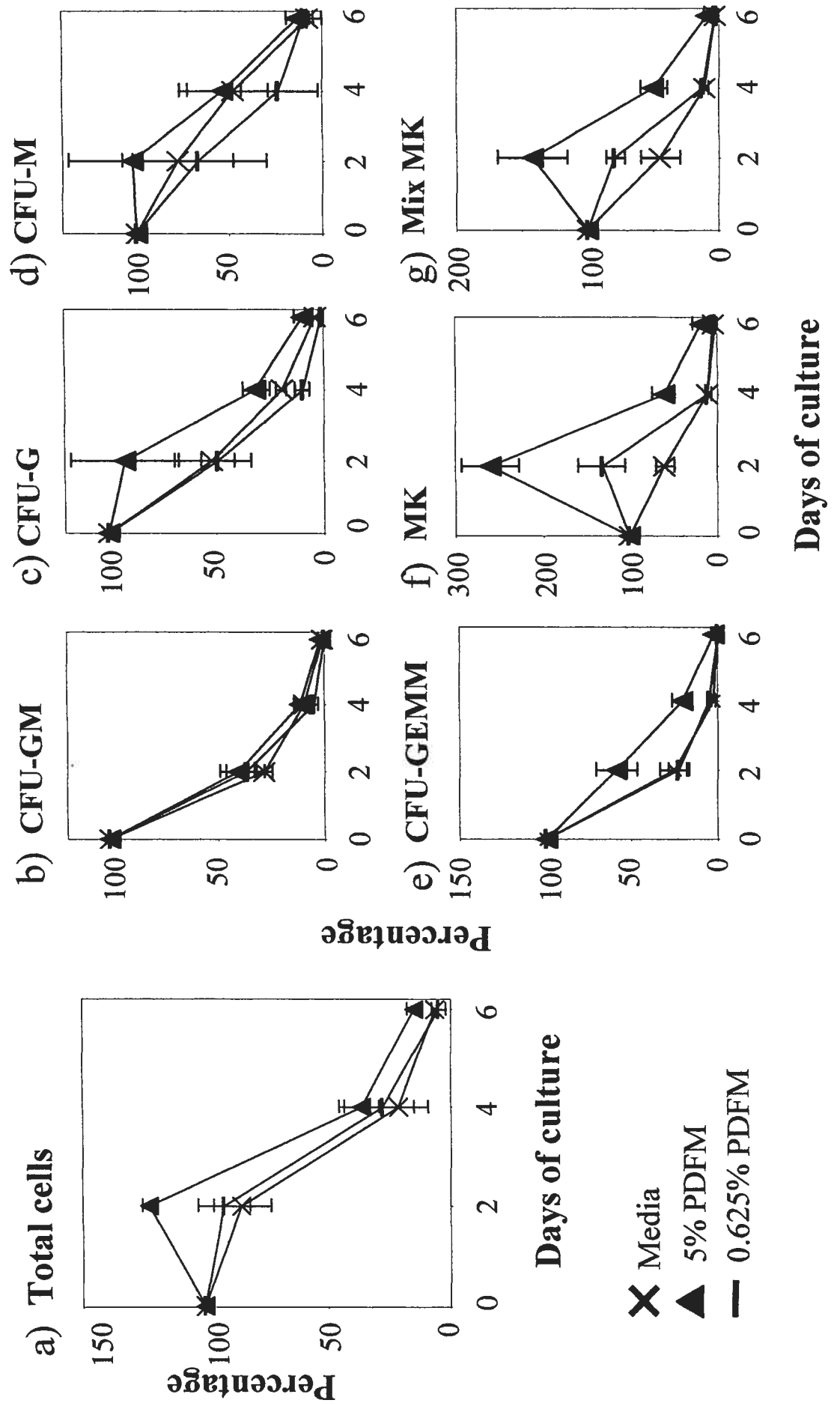


Figure 2

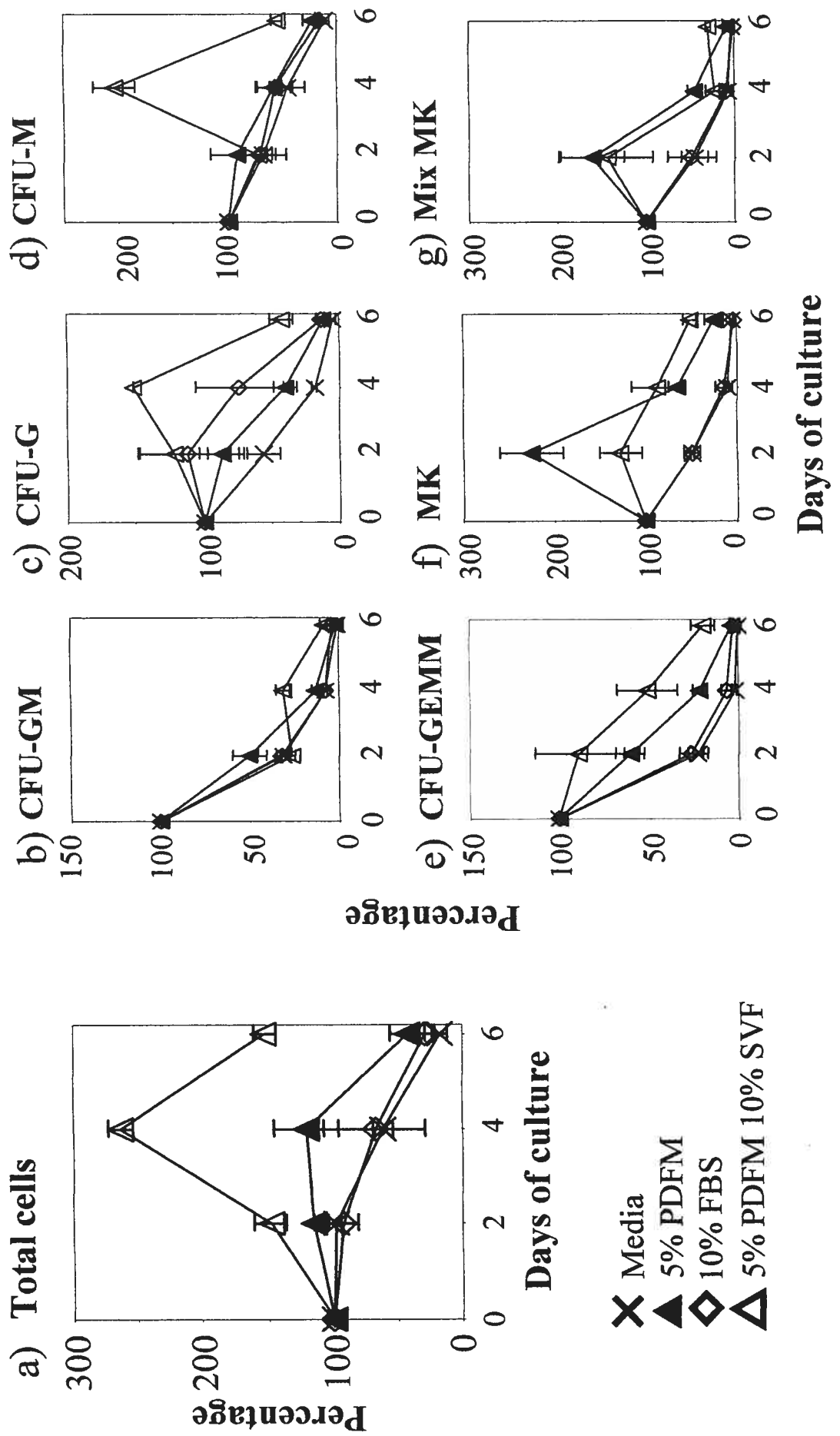


Figure 3

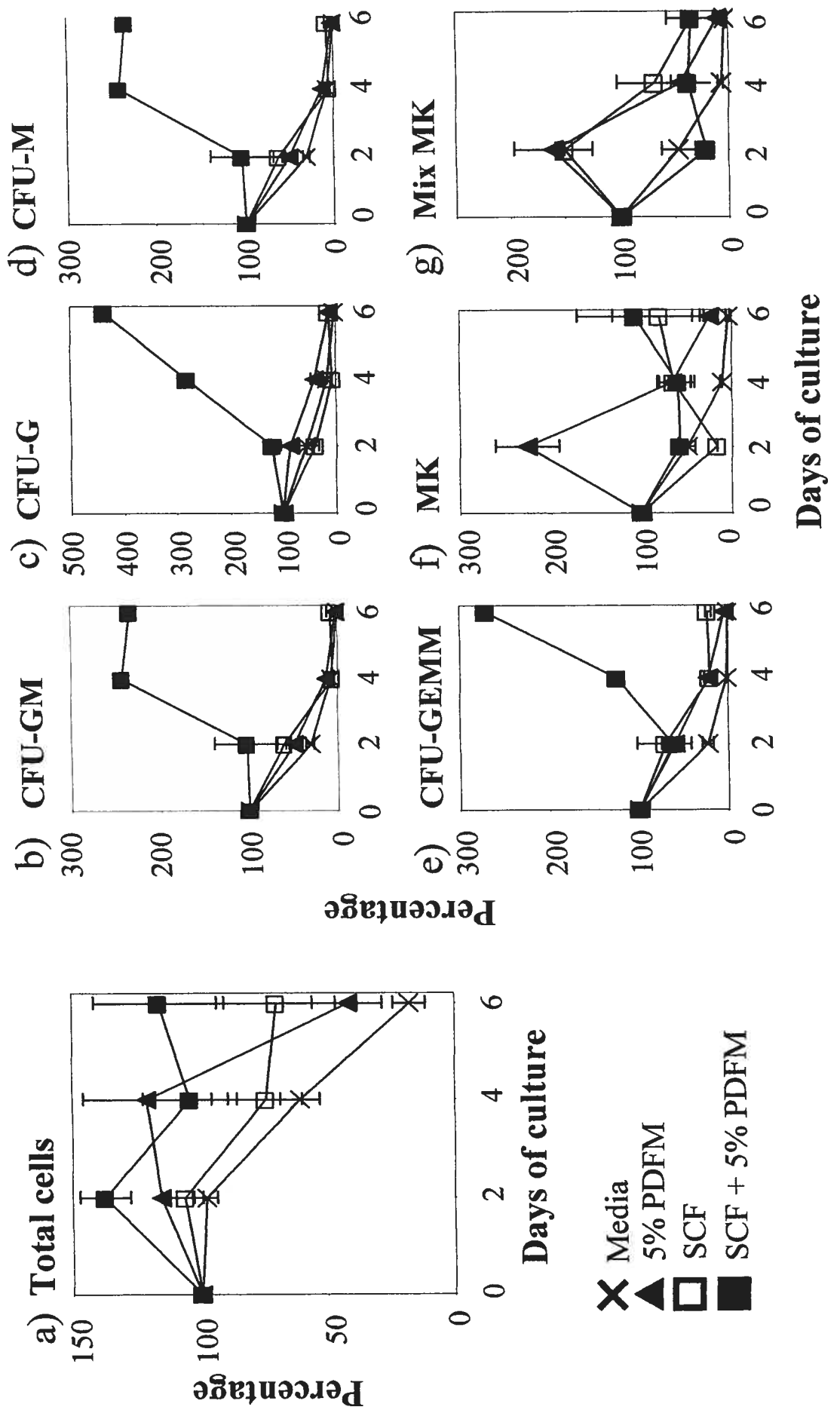


Figure 4

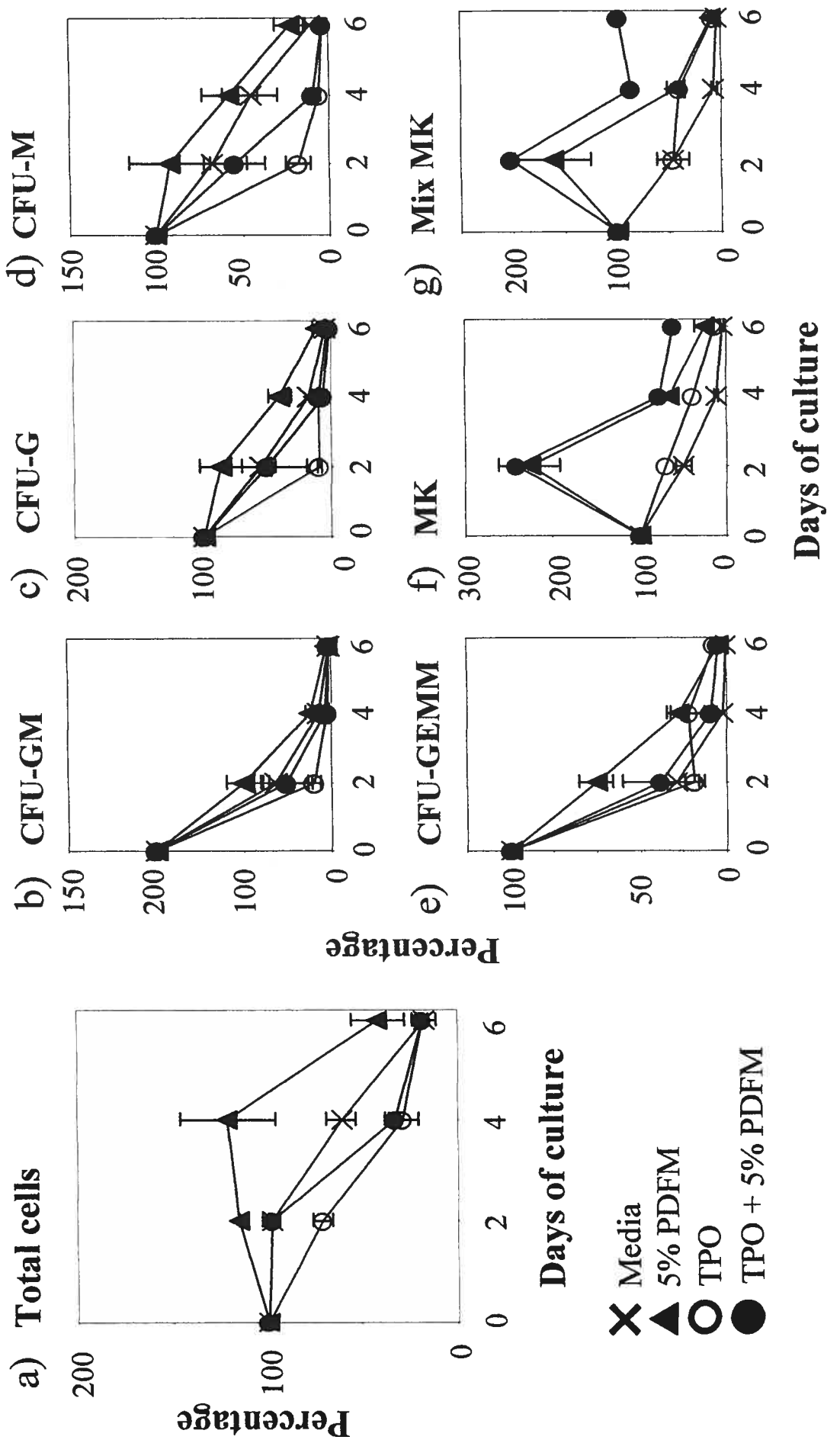


Figure 5

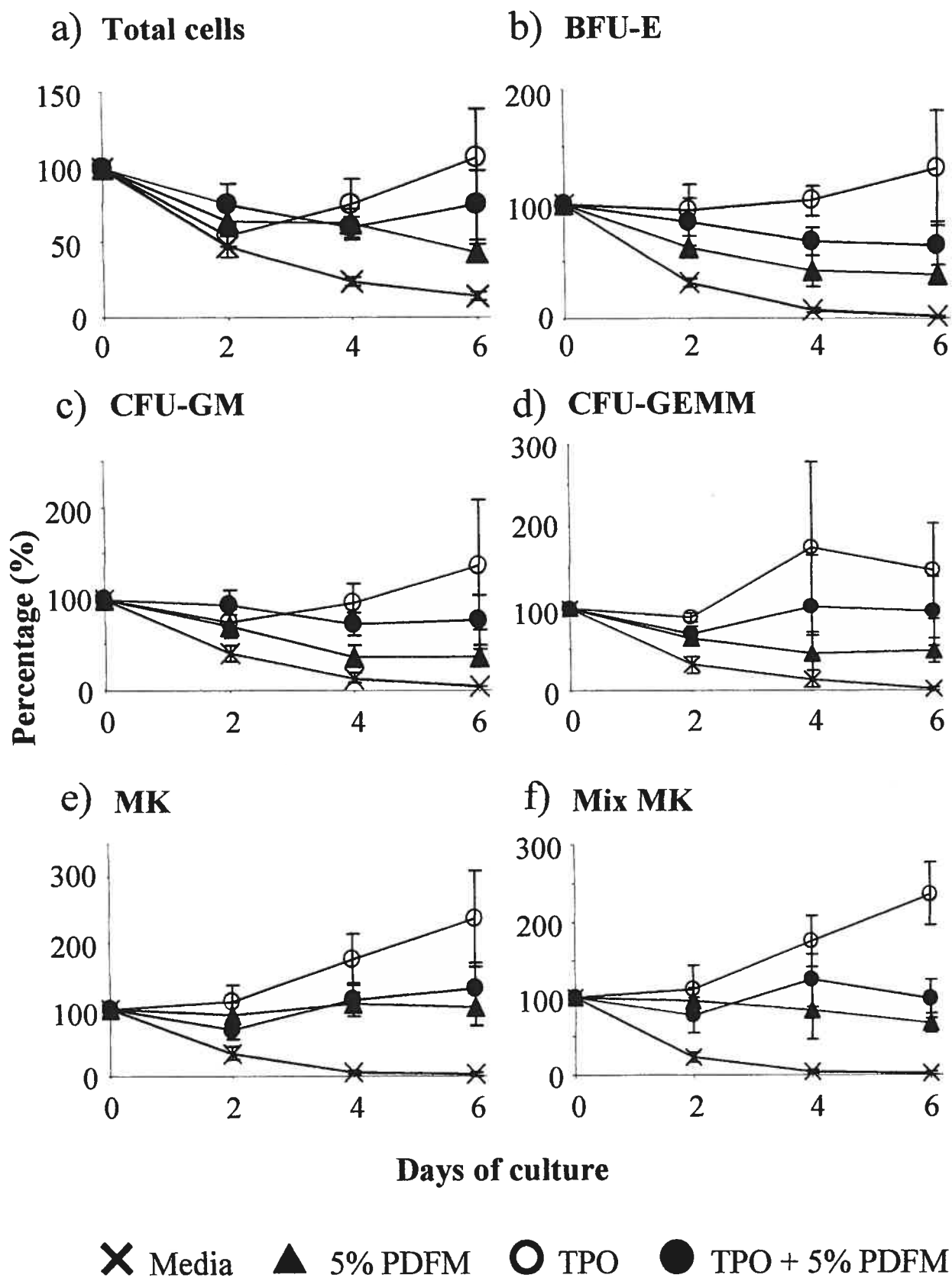




Figure 6

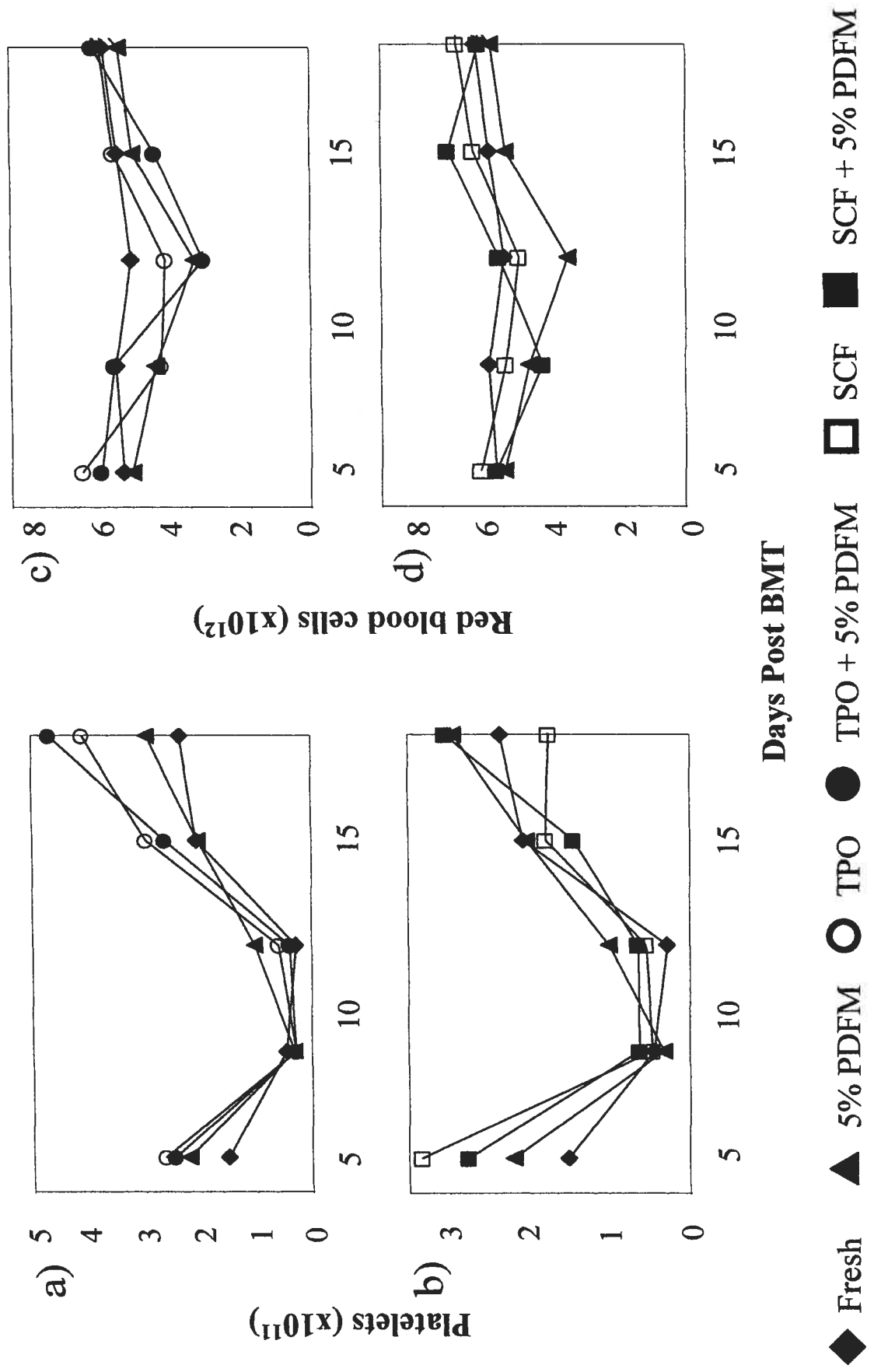
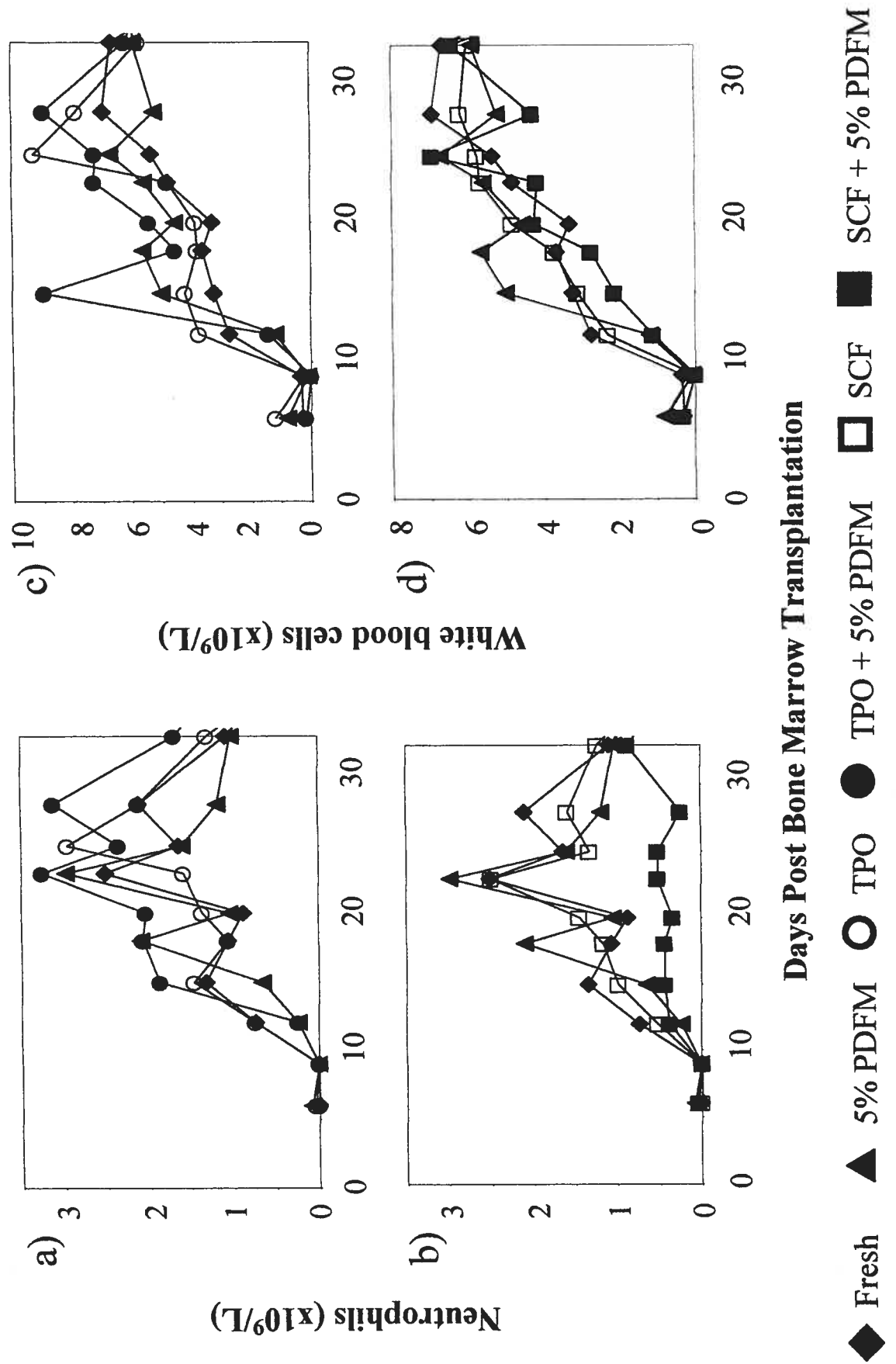


Figure 7



## **DISCUSSION DES RÉSULTATS**

## 9. DISCUSSION

La cytopénie est l'une des complications majeures de la GCSH. Elle est causée par une élimination des cellules hématopoïétiques du sang circulant par le traitement myéloablatif, incorporant chimiothérapie et/ou radiothérapie, qui accompagne habituellement la greffe. Cet effet secondaire a comme conséquence, entre autres, une augmentation du risque d'hémorragie et une altération de la réponse immunitaire. La transfusion sanguine est le moyen le plus courant de nos jours pour pallier cette condition. Elle implique cependant des risques de transmission d'infections virales et bactériennes ainsi que des risques d'alloimmunisation. L'expansion *ex vivo* est une stratégie étudiée par de nombreux investigateurs et a pour but d'augmenter le potentiel thérapeutique des CSH. L'idée derrière cette méthode est de diminuer, et peut être même éliminer, la période d'aplasie qui suit la chimiothérapie intensive.

### 9.1 Pertinence du projet

La GCSH est une stratégie fréquemment utilisée pour le traitement d'une grande variété de maladies hématologiques ou non hématologiques. Au cours des dernières années, les GCSH autologues ont été de plus en plus fréquentes lors du traitement de différents cancers afin de permettre une reprise plus rapide du système hématopoïétique suite à des régimes intenses de chimiothérapie. Cependant, de nombreux patients présentent des complications importantes de la cytopénie et de son traitement (transfusions érythrocytaires et plaquettaires, antibiothérapie, etc.), complications qui peuvent même entraîner le décès.

L'expansion *ex vivo* résulte en l'amplification de la population des progéniteurs commis suite à un processus de différenciation contrôlé ou en l'amplification du pool de CSH par l'entremise d'une régénération de la population des progéniteurs précoces. Manifestement, les deux processus peuvent prendre place de façon simultanée, reproduisant, *in vitro*, les interactions complexes des mécanismes régulateurs qui permettent l'hématopoïèse *in vivo*. L'expansion *in vitro* du pool

de CSH s'est avéré être une tâche difficile. Jusqu'à présent, les facteurs capable d'agir spécifiquement sur les CSH ayant un pouvoir de repopulation demeurent très limités et leur impact clinique inconnu. Des données récentes suggèrent des facteurs tels que HOXB4, Notch, Sonic Hedgehog et Wnt contrôleraient le développement des cellules souches sans provoquer la différenciation de celles-ci<sup>117-120,124,141-143</sup>.

L'amplification de la population de progéniteurs commis a été réalisée par différents investigateurs. L'objectif principal de ces études était de trouver la combinaison de cytokines la plus efficace pour générer une plus grande quantité de progéniteurs hématopoïétiques à court terme (CFU-GM, BFU-E, CFU-MK,...). La démonstration d'une expansion parfois importante (1000 X) ne garantit cependant pas que la reconstitution hématopoïétique à long terme est possible. En effet, plusieurs données démontrent qu'une expansion non contrôlée entraîne une diminution du pool de cellules souches et que la reconstitution à long terme des receveurs est altérée<sup>144-146</sup>.

## **9.2 But du projet et résultats obtenus**

Nous avons vérifié, lors de cette étude, la capacité d'un extrait plaquettaire à augmenter la quantité de progéniteurs hématopoïétiques contenus dans une population cellulaire donnée. Notre hypothèse initiale était que les plaquettes possèdent des facteurs de croissance mégakaryocytaires et des protéines stabilisatrices qui devraient permettre une expansion des progéniteurs, plus particulièrement des progéniteurs MK<sup>147,148</sup>. Nous avons donc procédé à l'évaluation du potentiel d'expansion *ex vivo* du PDFM par des expériences *in vitro* pour l'évaluation de l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques et *in vivo* pour valider les conditions de culture dans un modèle murin.

Dans la première partie du projet, nous avons démontré que le PDFM entraînait une augmentation significative des progéniteurs mégakaryocytaires dans une

culture à court terme sans sérum et une prolongation de la survie des progéniteurs myéloïdes. Un effet synergique entre le SCF et le PDFM a été observé pour la promotion des progéniteurs myéloïdes mais non des progéniteurs mégakaryocytaires.

La seconde partie du projet a permis de constater que le PDFM permettait de soutenir la croissance des progéniteurs MK contenus dans une population de cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon ombilical. De plus, les progéniteurs myéloïdes ont été maintenus d'une manière plus soutenue à l'ajout de ce composé.

En dernier lieu, nous avons démontré que l'incubation du greffon avec le PDFM permet de le maintenir dans un état comparable à celui de la MO. De plus, le taux de plaquettes semble augmenter plus précocement chez ces souris que celles greffées avec de la MO fraîche.

Ainsi, le PDFM permet une expansion significative des progéniteurs MK de la MO totale et le maintien des progéniteurs mégakaryocytaires d'une population de cellules CD34<sup>+</sup> de SC. Cette expansion semble être à l'origine d'une reprise plaquettaire plus précoce.

## 10. Expansion *ex vivo* des progéniteurs hématopoïétiques murins

L'efficacité de l'expansion *ex vivo* ne repose pas uniquement sur l'action individuelle des facteurs de croissance sur les CSH ou les progéniteurs hématopoïétiques mais plutôt sur l'interaction entre les différents facteurs présents. Un bon nombre de facteurs de croissance n'ont qu'un effet d'expansion modéré ou encore nul alors que cet effet est décuplé lorsqu'on les met en présence d'autres facteurs. La recherche de conditions de culture reflétant ce qui se produit *in vivo* constitue l'objectif majeur de l'expansion *ex vivo*.

Il a été démontré que les plaquettes, lorsqu'elles sont activées et qu'elles relâchent leur contenu dans l'organisme, exercent un contrôle sur la production de nouvelles plaquettes<sup>149,150</sup>. Notre hypothèse de travail se base sur le contenu des plaquettes et tente d'exploiter le pouvoir potentiel qu'offrirait ce cocktail de facteurs. De nombreux avantages pourraient être tirés de ce composé, d'abord il devrait contenir des facteurs de croissance en proportion permettant une action concertée et efficace, ensuite il permet de regrouper différentes composantes sous un seul produit. Ce regroupement de différentes molécules représente un problème au plan expérimental puisqu'il rend difficile l'analyse individuelle des différentes composantes et de leur effet. Cependant, au plan clinique, il représente un avantage très important puisqu'un seul produit peut être utilisé afin d'amener une croissance des progéniteurs hématopoïétiques. Comme nous savons que la plupart des cytokines utilisées seules ont un effet limité sur les progéniteurs, nous n'avons pas été surpris d'observer une activité significative du PDFM. Il est aussi intéressant de noter que la production de PDFM pourrait probablement être réalisée à plus faible coût que celui des cytokines recombinantes, dont très peu sont disponibles pour usage clinique. Enfin, ce produit pourrait être de nature autologue, et donc sans danger d'alloréactivité ou d'infection.

### ***10.1 PDFM : test d'agrégation plaquettaire***

Nous avons remarqué, au début de nos expériences avec le PDFM, que des amas fibreux se formaient après 2 jours de culture avec le PDFM. Ces amas contenaient un grand nombre de cellules que nous perdions lors de la centrifugation. Nous avons alors procédé à un test d'agrégation plaquettaire. Ce test a démontré que le PDFM, à une concentration de 50%, entraînait une agrégation plaquettaire de 84%, résultat qui est comparable au contrôle positif, la ristocétine. Bien sûr, nous utilisons le PDFM à une concentration de 5% v/v, cependant, le test a démontré que même à une concentration de 3.125%, le PDFM induit une légère agrégation plaquettaire (22%). Le PDFM étant un extrait de plaquettes matures, il est probable qu'il contient des agents activateurs et des agents agrégants comme la thromboxane A<sub>2</sub>. Vu la présence d'un certain nombre de plaquettes dans la MO murine, c'est probablement ce phénomène d'activation et d'agrégation qui entraînait la formation d'amas fibreux dans le milieu de culture liquide. C'est pour éviter la perte cellulaire causée par ce phénomène que nous avons ajouté à notre protocole de préparation de la MO murine un étape de lavage plaquettaire afin d'éliminer le plus possible les plaquettes et ainsi l'agglomération des cellules. En éliminant les plaquettes, nous avons ainsi pu bloquer cette réaction d'agrégation. Comme cette séparation des plaquettes est une procédure relativement simple qui est réalisée de façon routinière lors de la manipulation de la grande majorité des greffons humains pour utilisation clinique, nous ne croyons pas que cet effet soit limitatif dans l'expansion de cellules humaines.

### ***10.2 Effet du PDFM sur les progéniteurs murins***

#### ***10.2.1 Effet préférentiel du PDFM sur les progéniteurs mégakaryocytaires***

Comme nous avons pu le voir au cours des premières expériences effectuées avec le PDFM, les progéniteurs myéloïdes, c'est à dire les CFU-GM, les CFU-G, les CFU-M et les CFU-GEMM, ne sont pas particulièrement favorisés par ce produit.



En effet, les résultats montrent que l'incubation de la MO murine avec le PDFM n'offre qu'un faible avantage au niveau de la conservation de ces progéniteurs par rapport aux cellules incubées dans du milieu non supplémenté. L'effet du PDFM a cependant été plus remarquable sur les progéniteurs MK, que ce soit au niveau de l'expansion des CFU-MK purs (260 %) ou encore des progéniteurs MK mixtes (142%), qui contient des cellules provenant d'une autre lignée (érythrocytaire, granulocytaire ou monocytaire) et qui sont des colonies plus immatures que les colonies MK pures ( $p= 0.018$  et  $0.04$ ). Ces premiers résultats nous permettent donc de constater que le PDFM contient effectivement des composantes qui permettraient une amplification significative des progéniteurs d'origine mégakaryocytaire. L'utilisation *in vivo* de certains facteurs de croissance semble favoriser la croissance de leur lignée-cible au détriment d'autres lignées. Ainsi, il est postulé que dans certains cas, l'utilisation du G-CSF nuise à la reconstitution plaquettaire en favorisant la prolifération et la démarginalisation granulocytaire. L'absence d'effet toxique du PDFM sur les progéniteurs hématopoiétiques des autres lignées est cependant remarquable. L'utilisation du PDFM pour accélérer la reprise hématologique ne devrait donc pas avoir d'effet délétère sur les différentes lignées cellulaires hématopoiétiques.

#### 10.2.2 *Quel constituant des plaquettes pourrait être responsable de cet effet?*

⇒Rôle du PDGF?

Les plaquettes contiennent, dans leurs granules- $\alpha$ , une cytokine que l'on nomme le Platelet Derived Growth Factor (PDGF). Le PDGF est relâché lors de l'exocytose des plaquettes. Des évidences montrent qu'il est impliqué dans un bon nombre de maladies caractérisées par une prolifération cellulaire excessive et qu'il pourrait jouer plusieurs rôles dans des situations physiologiques normales. Cette cytokine est potentiellement une des molécules importantes impliquées dans l'effet du PDFM sur les progéniteurs mégakaryocytaires. Le PDGF a rarement été utilisé dans le contexte de l'expansion *ex vivo*. Cependant, une étude faite sur de la MO de souris a démontré que des concentrations de 10 à 50 ng/ml de PDGF

stimulaient la formation de colonies mégakaryocytaires de 275% à 450%<sup>151</sup>. Comme nous avons utilisé une concentration de 5% v/v de PDFM dans notre milieu de culture, et sachant que le PDFM contient 0.269 µg/ml de PDGF, nous avons l'équivalent d'une concentration de 13.25 ng/ml de PDGF dans notre milieu de culture. En comparant nos résultats à ceux obtenus par Yang et al., nous obtenons un résultat similaire à celui que ces investigateurs ont obtenu à une concentration de 10 ng/ml. Le PDGF exercerait donc une régulation positive des la mégakaryocytopoïèse *in vitro*. De plus, des récepteurs fonctionnels du PDGF ont été retrouvés sur les MK humains et leur habileté à générer une réponse mitogénique a été démontrée<sup>152</sup>.

### ***10.3 Effet de l'ajout de sérum dans la culture liquide***

#### ***10.3.1 Augmentation des progéniteurs myéloïdes en présence de sérum***

L'ajout de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) à notre milieu de culture liquide a quelque peu modifié les résultats que nous avons obtenus. Tout d'abord, la présence du SVF et du PDFM dans le milieu de culture a permis une augmentation notable (260%) du nombre total de cellules en culture. Le sérum contiendrait donc des facteurs de croissance qui favoriseraient l'expansion *ex vivo* de ces progéniteurs. De plus, on a vu une expansion des CFU-G et des CFU-M de 150% et de 210% respectivement après 4 jours de culture. Cependant, on remarque une diminution accrue des CFU-GM après 2 jours de culture en présence de SVF, ce qui nous porte à croire que le SVF aurait poussé les progéniteurs immatures CFU-GM à se différencier en progéniteurs plus matures CFU-G et CFU-M.

#### ***10.3.2 Diminution de l'expansion des progéniteurs MK en présence de SVF ⇒ Rôle du TGF-β dans ce phénomène***

Contrairement aux progéniteurs myéloïdes, les progéniteurs MK purs (CFU-MK) ont vu leur expansion diminuée de façon importante suite à l'ajout de sérum dans

le milieu de culture. Nous avons pu remarquer que cette diminution est moins prononcée pour les colonies mégakaryocytaires mixtes composées de plusieurs types de cellules. Il a été démontré par différents investigateurs que le sérum contient des inhibiteurs potentiels des cellules de la lignée mégakaryocytaire relâchés par les plaquettes<sup>153-155</sup>. Le TGF- $\beta$  a été identifié comme étant le facteur inhibiteur le plus puissant de la croissance des mégakaryocytes. En effet, l'utilisation d'anticorps neutralisants contre le TGF- $\beta$  dans du milieu contenant du sérum a permis une expansion des cellules similaire à celle observée dans un milieu ne contenant pas de sérum<sup>156</sup>. Nos résultats confirment donc que l'ajout de sérum diminue l'expansion des progéniteurs mégakaryocytaires que l'on réussit à promouvoir avec le PDFM dans un milieu sans sérum.

#### ***10.4 Le TGF- $\beta$ pourrait-il être responsable de l'efficacité modérée du PDFM sur les progéniteurs MK?***

Le PDFM étant un extrait de plaquettes matures, il est logique qu'on y retrouve une certaine proportion de TGF- $\beta$ . Comme l'a montré l'analyse de certaines composantes du PDFM, on y retrouve du TGF- $\beta$ 1 et du TGF- $\beta$ 2<sup>157</sup>. Ces molécules sont considérées comme des facteurs pléiotropiques pouvant exercer des effets positifs ou négatifs sur la prolifération, la différenciation ou encore la mort cellulaire, selon les conditions environnantes<sup>158</sup>. Il a été démontré que le TGF- $\beta$  exerçait un effet inhibiteur sur les stades précoces et avancés de la mégakaryocytopoïèse<sup>159-162</sup>. De plus, dans certaines situations pathologiques où on observe des taux de plaquettes anormalement élevés, on a remarqué une diminution de la sensibilité des progéniteurs mégakaryocytaires au TGF- $\beta$ <sup>163</sup>. Il serait donc possible que l'ajout de TGF- $\beta$  au milieu de culture pour l'expansion *ex vivo* via le PDFM puisse diminuer l'efficacité de ce composé à promouvoir la prolifération des progéniteurs mégakaryocytaires. L'extraction du TGF- $\beta$  du PDFM serait peut-être une stratégie qui devrait permettre d'augmenter le potentiel du PDFM pour l'expansion *ex vivo*. D'ailleurs, des efforts sont présentement élaborés dans cette optique.

### ***10.5 Effet de la combinaison du PDFM avec différentes cytokines***

Pour compléter notre étude de l'effet du PDFM sur les cellules de la MO murine, nous avons combiné ce produit avec différentes cytokines pour voir si nous pouvions obtenir un effet additif ou synergique. Nous avons tout d'abord procédé à une expérience préliminaire où nous avons combiné le PDFM et l'IL-6 (résultats non présentés). L'addition d'IL-6 n'a ni amélioré ni diminué l'effet du PDFM seul, c'est pourquoi nous n'avons pas procédé à plus d'expériences avec cette cytokine. Il est probable que l'addition d'IL-6 en plus d'autres cytokines comme l'IL-3 aurait pu avoir un effet bénéfique, cependant, comme notre but premier était de limiter les facteurs de croissance utilisés, question de coûts et de disponibilité clinique, nous n'avons pas procédé à la combinaison de plus d'une cytokine au PDFM.

Le SCF est le second facteur de croissance que nous avons combiné au PDFM. Le SCF est reconnu comme agissant en synergie avec plusieurs facteurs de croissance, c'est pourquoi nous avons cru bon de le jumeler au PDFM. Il semble que la combinaison du PDFM et du SCF soit particulièrement efficace au niveau des progéniteurs myéloïdes. En effet, nous avons remarqué une augmentation des CFU-GM et des CFU-GEMM, les progéniteurs les plus immatures, et une expansion jusqu'à la fin de la période de culture à court terme des CFU-G et des CFU-M, des progéniteurs plus matures. Cependant, nous avons constaté que cet effet du PDFM et du SCF s'effectuait au détriment de la prolifération des progéniteurs MK purs. En effet, l'effet obtenu par le PDFM seul est éliminé lorsqu'on combine le PDFM et le SCF. Il semble donc que le SCF pousse les progéniteurs immatures à se différencier dans la lignée granulocyte-macrophage, et ceci au détriment de la lignée mégakaryocytaire.

La dernière cytokine à être jumelée au PDFM a été la TPO, le régulateur majeur de la lignée mégakaryocytaire. Dans les conditions de culture utilisées, nous avons noté que la TPO seule n'avait pas d'effet sur le nombre de cellules en

culture ni sur aucun des progéniteurs, qu'ils soient myéloïdes ou mégakaryocytaires. Nous avons cependant noté que l'effet de la TPO s'exerce souvent à long terme, ce qui démontre une activité différencielle des 2 produits. La combinaison du PDFM et de la TPO n'a pas changé l'expansion des progéniteurs mégakaryocytaires médiée par le PDFM seul et n'a pas augmenté significativement la croissance des progéniteurs mégakaryocytaires mixtes.

Nous constatons donc, après cette série d'expériences, que la combinaison du PDFM avec le SCF a un effet synergique sur les progéniteurs myéloïdes. Il nous est difficile d'identifier quelle(s) composant(es) du PDFM agit en synergie avec le SCF. Le PDGF est certainement une option intéressante, cependant l'utilisation combinée de ces 2 facteurs de croissance très peu caractérisée dans la littérature, voire même inexistante.

## 11. Expansion *ex vivo* des progéniteurs de sang de cordon ombilical

### 11.1 *Le PDFM maintien les progéniteurs MK dans une culture à court terme de cellules CD34+*

Le sang de cordon ombilical (SC) est considéré comme une source importante de CSH et de progéniteurs hématopoïétiques. Les possibilités de transplantation d'adultes avec ces cellules sont cependant limitées par la quantité de cellules disponibles. L'expansion *ex vivo* de ces cellules permettrait donc une augmentation de la taille du greffon de cellules de SC et ainsi accroître le nombre de patients éligibles à cette procédure.

Nous avons observé que l'incubation de cellules CD34+ de SC avec le PDFM permet de maintenir la totalité des progéniteurs mégakaryocytaires présents à l'origine et ce de façon significativement plus élevée que lorsqu'on aux cultures contrôles ( $p < 0.05$ ). Ces résultats diffèrent légèrement de ceux obtenus avec de la MO murine totale, où l'on avait observé une expansion maximale de 260% des progéniteurs mégakaryocytaires après 2 jours de culture. Il a été postulé que le PDGF, une des composantes principales du PDFM, pourrait exercer son effet sur les cellules hématopoïétiques directement ou encore via le relâchement de facteurs de croissance par les cellules de nature conjonctive contaminantes<sup>164,165</sup>. Ces cellules d'origine mésenchymateuses sont particulièrement présentes dans le microenvironnement de la MO. Il se peut que la présence de ces cellules dans la MO totale permette une expansion des progéniteurs mégakaryocytaires plus grande qu'avec une population sélectionnée cellules CD34+ de SC. Cependant, nous constatons que le PDFM réussit à maintenir les progéniteurs mégakaryocytaires de façon efficace pour une période allant jusqu'à 6 jours et que l'ajout de ce cocktail de facteurs de croissance est bénéfique lors d'une incubation à court terme de cellules CD34+. Il est possible que ce degré d'activité soit attribuable à la nature porcine du PDFM et que du PDFM d'origine humaine soit

d'une plus grande efficacité. De plus, si l'on compare ces résultats à ceux obtenus en présence de TPO, considéré que le régulateur majeur des progéniteurs mégakaryocytaires, la différence observée n'est pas significative entre les deux conditions ce qui nous permet constater que le PDFM a effectivement un effet non négligeable sur les progéniteurs mégakaryocytaires.

### ***11.2 Effet de maintien des progéniteurs myéloïdes et érythroïdes***

L'effet du PDFM est caractérisé par un maintien des progéniteurs myéloïdes et érythroïdes provenant de cellules CD34<sup>+</sup> de SC. Le niveau d'expansion est cependant plus modeste que celui observé pour les progéniteurs mégakaryocytaires. Néanmoins, les BFU-E, les CFU-GM et les CFU-GEMM sont significativement plus élevés en présence de 5% de PDFM que dans du milieu X-Vivo 15 seul, notre contrôle ( $p < 0.05$ ). On constate que, même si le PDFM semble avoir une action préférentielle sur les progéniteurs des mégakaryocytes, les progéniteurs myéloïdes et érythroïdes sont également influencés par ce composé. Il a été démontré que le PDGF, présent dans le PDFM, avait une action de promotion sur l'érythropoïèse ainsi que sur les progéniteurs CFU-GEMM et CFU-GM<sup>166,167</sup>, il se pourrait donc que ce soit attribuable en partie à ce facteur de croissance.

### ***11.3 Diminution des progéniteurs MK lors de la combinaison du PDFM et de la TPO***

#### ***⇒Influence du TGF- $\beta$***

La combinaison du PDFM avec la TPO nous a fourni des résultats plutôt étonnants. En effet, la combinaison de ces deux facteurs de croissance a provoqué une diminution de l'efficacité de la prolifération des progéniteurs mégakaryocytaires engendrée par la TPO seule. Ce phénomène a pu être observé à des niveaux plus faibles pour les colonies érythroïdes et myéloïdes. Même si ces données ne sont pas statistiquement significatives, il semble que l'ajout du PDFM atténue l'effet de la TPO seule. Il a été démontré que la TPO provoquait

l'augmentation de la quantité de récepteurs à TGF- $\beta$  I et II à la surface des progéniteurs mégakaryocytaires et ce après 2 et 4 jours de stimulation avec la TPO<sup>168</sup>. Cette incubation avec la TPO entraîne donc une plus grande susceptibilité des progéniteurs mégakaryocytaires à la suppression engendrée par le TGF- $\beta$ . Il est donc possible que dans nos conditions de culture, un phénomène similaire se soit produit. La TPO présente dans le milieu augmenterait ainsi les récepteurs à TGF- $\beta$  (I et II) sur les progéniteurs MK et le TGF- $\beta$  (I et II) présent dans le PDFM exercerait un plus grand pouvoir de suppression sur ces mêmes progéniteurs. Ces investigateurs ont également vu un effet de suppression sur les BFU-E et sur les CFU-GM, cependant ils ont démontré que cet effet est 2 et 5 fois plus élevé pour les CFU-MK<sup>169</sup>. Ils considèrent donc la suppression par le TGF- $\beta$  relativement spécifique aux progéniteurs mégakaryocytaires.

Dans un modèle de régulation *in vivo* de la mégakaryopoïèse, le TGF- $\beta$  provenant des plaquettes ou des MK détruits stimule la production de TPO par les cellules stromales de la MO. La TPO, à son tour, stimule les cellules souches (CD34+) à se commettre à la lignée mégakaryocytaire et à exprimer le récepteur à la TGF- $\beta$ . Ces cellules seront ensuite plus susceptibles à la suppression par le TGF- $\beta$ . Dans certaines situations pathologiques comme l'ITP, un déséquilibre est créé. La destruction de plaquettes étant haussée, une plus grande quantité de TGF- $\beta$  est présente, augmentant donc la production de TPO mais exerçant une suppression plus grande sur les progéniteurs MK.



## 12. Modèle murin de GCSH

### 12.1 Mise au point du modèle de GCSH

À la lumière des résultats obtenus lors de nos expériences *in vitro* sur la MO de souris et le SC, nous avons procédé à l'élaboration d'un modèle de greffe de MO murin. Lors de la première greffe effectuée, les souris C57BL/6J ont reçu une dose létale d'irradiation de 1000 cGy et ont été reconstituées avec 500 000 cellules de MO de souris syngéniques : 1) fraîches, 2) incubées durant 2 jours dans du milieu non supplémenté, et 3) incubées durant 2 jours avec 5% PDFM (n=4 pour chaque groupe). Le choix de cette durée de la culture liquide était basé sur les résultats obtenus avec le PDFM dans les expériences *in vitro*. Aucune différence significative n'a été observée pour cette première greffe entre les souris greffées avec la MO fraîche et la MO traitée avec le PDFM au niveau du temps de reprise des plaquettes, des globules rouges et des globules blancs. La seule différence était au niveau de la forme physique globale des souris. Celle dont le greffon avait été incubé avec le PDFM semblaient physiquement plus vigoureuses, cependant nous ne pouvons utiliser cette information vu la difficulté de quantifier ce paramètre. Par contre, toutes les souris greffées avec de la MO mise en culture dans du milieu non supplémenté sont décédées après 12 jours, c'est-à-dire 2 jours plus tard que nos souris contrôles non reconstituées, alors que celles dont le greffon a été traité avec le PDFM ont survécu jusqu'à la fin de la période d'évaluation de 100 jours ( $p=0.025$ ). Cette observation indique que le PDFM contient des facteurs de croissance qui permettent le maintien des cellules progénitrices indispensables à la reconstitution d'un individu, puisque ces cellules sont rapidement éliminées lorsqu'on ne leur fournit aucun support.

### 12.2 Reprise plaquettaire précoce chez les souris dont la MO a été traitée avec le PDFM

Vu la mortalité élevée dans le précédent modèle, nous avons diminué la dose d'irradiation à 850 rad. Nous avons ainsi pu effectuer une greffe où nous avons

évalué les conditions de culture *in vitro* dans un modèle de GMO *in vivo*. La MO administrée aux souris C57CL/6J provenait de souris B6SJL possédant l'antigène Ly5.1 afin de pouvoir vérifier la prise du greffon par cytométrie en flux. Les différents groupes étaient les suivants : 1) MO fraîche, 2) MO incubée avec 5% PDFM, 3) MO incubée avec la 100 ng/ml de TPO, 4) TPO + 5% PDFM, 5) MO incubée avec 100 ng/ml de SCF et 6) SCF + 5% PDFM (n=6 pour chaque groupe). Les données recueillies au cours de cette expérience nous ont permis de confirmer qu'une incubation du greffon durant 2 jours avec 5% de PDFM n'altérerait pas la reconstitution hématopoïétique des souris irradiées.

L'apport positif du PDFM semble se situer principalement au niveau de la reprise plaquettaire. En effet, nous avons observé une hausse des plaquettes significativement plus précoce chez les souris dont le greffon a été incubé avec le PDFM en comparaison avec les souris greffées avec de la MO fraîche ( $p=0.0023$ ) ou de la MO incubée avec la TPO durant 2 jours ( $p=0.003$ ). En effet, le niveau de plaquettes après 12 jours chez les souris dont le greffon a été traité avec le PDFM est 3.6 fois plus élevé que celles ayant reçu de la MO fraîche et 1.7 fois plus élevé que celles dont le greffon a été incubé avec la TPO. On assiste donc à une remontée plus hâtive des plaquettes chez les souris dont le greffon a été traité avec le PDFM. Le niveau de plaquettes atteint à ce moment est inférieur au niveau seuil utilisé dans une autre étude d'expansion, qui se situe à 200 000 plaquettes/ $\mu\text{l}$ <sup>170</sup>. Mais nous croyons que cette dernière valeur qui représente 20% de la valeur normale est probablement trop élevée et qu'une récupération rapide, même à un niveau plus faible est un élément important pour prévenir l'hémorragie. Nous concluons donc que le PDFM entraîne une remontée des plaquettes plus hâtive qu'un greffon frais. De plus, la période d'incubation *ex vivo* n'a pas altéré la reconstitution hématopoïétique à long terme du receveur.

Pour ce qui est de la reprise des globules rouges, nous remarquons que chez les souris dont le greffon a été mis en contact avec le PDFM, les valeurs sont légèrement sous les valeurs obtenues avec un greffon frais. Cependant, cet écart

n'est pas significatif et les valeurs ne descendent pas en-dessous de la valeur seuil établie à 50% de la valeur normale ( $\sim 4.7 \times 10^{12}$  érythrocyte/L).

D'autres résultats intéressants proviennent de l'évaluation de la reprise des neutrophiles après la greffe. En effet, nous avons observé que le taux de neutrophiles des souris ayant reçu un greffon traité avec le PDFM a dépassé la valeur seuil,  $> 2 \times 10^9$  neutrophiles/L, après 18 jours. Cette valeur a été atteinte après 23 jours par les souris auxquelles on a administré de la MO fraîche. De plus, les souris dont le greffon a été mis en présence de TPO et de PDFM ont atteint ce seuil à 18 jours également alors que celles ayant reçu des cellules exposées à la TPO uniquement ont dépassé ce seuil après 25 jours. Quant à elles, les souris ayant reçu un greffon incubé avec le SCF et le PDFM ont eu des taux de neutrophiles en-dessous de la valeur seuil plus de 36 jours après la greffe. Nous pourrions relier ce phénomène à celui observé lors des expériences *in vitro* effectuées dans ces conditions. En effet, nous avons observé une expansion des progéniteurs CFU-GEMM jusqu'à 275% après 6 jours et des progéniteurs CFU-GM jusqu'à 250% après 4 jours en présence de PDFM et de SCF. L'expansion des CFU-G, les progéniteurs donnant naissance aux neutrophiles, a été en croissance jusqu'à 450% et ce après 6 jours de culture. Il se peut que l'expansion de 2 jours ait poussé les progéniteurs plus précoces à se différencier augmentant ainsi les progéniteurs plus matures mais épuisant le pool de progéniteurs immatures. Ceci pourrait expliquer la reprise retardée des neutrophiles après la greffe. Dans les expériences *in vitro*, l'exposition des cellules au SCF seul n'entraînait pas d'expansion des progéniteurs myéloïdes, cependant les souris greffées avec ces cellules ont eu une reprise des neutrophiles après 23 jours, ce qui nous pousse à penser que le SCF aurait un effet sur les progéniteurs plus immatures, et laisse suggérer un impact clinique potentiel.

### ***12.3 Le PDFM semble préserver les progéniteurs pour la reconstitution à long terme***

Nous avons effectué l'analyse des souris greffées environ 12 mois après la transplantation. Nous avons observé que les souris dont le greffon a été traité avec le PDFM possédaient des décomptes sanguins semblables aux souris greffées avec de la MO fraîche. De plus, la cellularité de la MO et de la rate était comparable à celle du contrôle. De façon très intéressante, les cellules des souris greffées à 1 an après la transplantation se sont révélées Ly-5.1 positives (95-98%), sans aucun marquage pour les cellules du receveur (Ly-5.2). Ceci indique donc que la reconstitution hématopoïétique à long-terme post-greffe origine des cellules du greffon et non des cellules de l'hôte, et ce malgré une incubation *in vitro* des CSH. Nous constatons donc que le PDFM préserve, lors de l'incubation *in vitro* de 2 jours, les progéniteurs nécessaires à la reprise hématopoïétique à long terme.

Nous avons discuté plus haut du TGF- $\beta$  et de l'effet inhibiteur qu'il exerce sur les progéniteurs mégakaryocytaires. Il a été démontré que ce facteur exerce un rôle défavorable lorsqu'on désire engendrer une expansion maximale des progéniteurs mégakaryocytaires. Cependant, il a également été démontré que le TGF- $\beta$ , plus particulièrement le TGF- $\beta$ 1, entraînerait une inhibition directe de la prolifération des LTR-HSC (Long Term Repopulating Hematopoietic Stem Cell), les cellules responsables de la repopulation à long terme, et ralentirait la différenciation de celles-ci <sup>171</sup>. En effet, le temps requis pour que ces cellules effectuent leur première division cellulaire semble retardé par la présence de TGF- $\beta$ 1, et ce à des concentrations (1 à 10 ng/ml) comparables à celles contenues dans notre milieu de culture. Il est donc possible que le TGF- $\beta$ 1 contribue à la préservation des CSH et à la reconstitution à long terme des cellules incubées avec le PDFM. Si cette hypothèse est plausible, l'extraction du TGF- $\beta$  du PDFM pourrait être bénéfique pour l'expansion des progéniteurs mégakaryocytaires alors que le potentiel de reconstitution à long terme du greffon pourrait être altéré. Cependant, il serait possible de ne traiter qu'une partie du greffon pour en accélérer la reprise

megakaryocytaire. L'autre partie de greffon serait utilisée intacte, pour favoriser la reconstitution à long terme. Dans ce contexte, très peu de progéniteurs hématopoïétiques sont requis.

### 13. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La greffe de cellules souches hématopoïétiques est considérée comme un traitement de choix pour un nombre grandissant de maladies, comme par exemple différentes formes de cancers ainsi que certains désordres immunologiques. Les transfusions sanguines demeurent de nos jours le traitement le plus utilisé pour pallier la cytopénie qui accompagne fréquemment cette intervention. Cependant, certaines stratégies expérimentales ayant pour objectif de diminuer les transfusions sont fréquemment accompagnées par des effets secondaires non négligeables, comme la transmission de virus et de bactéries ainsi que l'alloimmunisation. L'expansion *ex vivo* est une méthode qui vise à augmenter, suite à une manipulation *in vitro* du greffon, le nombre de progéniteurs et ainsi engendrer une reprise plus efficace des cellules sanguines. De nombreuses études ont été entreprises afin de déterminer la combinaison idéale de facteurs de croissance afin de générer une expansion maximale des progéniteurs hématopoïétiques. Des données préliminaires obtenues dans notre laboratoire avaient montré qu'un dérivé de plaquettes matures, le PDFM, contiendrait des facteurs de croissance permettant une expansion des progéniteurs hématopoïétiques, plus particulièrement des progéniteurs de la lignée mégakaryocytaire.

Les travaux que nous avons effectué au cours de ce projet ont permis de démontrer clairement que le PDFM entraîne une expansion significative des progéniteurs mégakaryocytaires de la MO murine et offre une prolongation de la survie des progéniteurs myéloïdes et ce à une concentration de PDFM de 5% v/v. Nous avons également observé que cette expansion était optimale dans un milieu sans sérum. De plus, une synergie a été observée entre le SCF et le PDFM, engendrant une expansion considérable des progéniteurs myéloïdes dans une culture à court terme. Un effet d'amplification du PDFM sur des cellules CD34+ provenant du SC a également été observé. Cette augmentation de la survie des progéniteurs mégakaryocytaires a été conservée jusqu'à 6 jours après le début de

culture liquide. Cependant, la combinaison du PDFM et de la TPO a provoqué une diminution de l'effet de la TPO utilisée seule. Nous postulons que ce phénomène soit causé par l'augmentation de la sensibilité des progéniteurs mégakaryocytaires au TGF- $\beta$ , une des composantes du PDFM.

La mise au point d'un modèle de GCSH nous permettant d'évaluer *in vivo* de l'effet du PDFM sur la reprise hématopoïétique a constitué la dernière partie de ce projet. Nous avons pu observer que l'incubation du greffon avec le PDFM entraîne une remontée significativement plus rapide du taux de plaquettes que la MO fraîche. De plus, cette incubation ne semble pas altérer le pouvoir de repopulation à long terme du greffon vu la reconstitution complète des souris et une formule sanguine comparable aux souris du groupe contrôle à la fin de la période d'observation (12 mois).

En conclusion, nous avons démontré que le PDFM possède des composantes qui génèrent une expansion importante des progéniteurs mégakaryocytaires de la MO murine totale et que cette expansion se reflète *in vivo* par une prise plaquettaire plus précoce. De plus, le PDFM préserve les progéniteurs mégakaryocytaires et myéloïdes contenus dans une population de cellules CD34+ de SC.

Il serait particulièrement intéressant de vérifier *in vivo* l'effet de l'expansion des cellules CD34+ du SC dans un modèle de GCSH dans des souris SCID/NOD, modèle nous permettant d'administrer des cellules humaines dans une souris. Même si nous n'avons pas observé d'expansion au niveau de cette population cellulaire, nous pourrions vérifier si le PDFM permet de maintenir l'intégralité du greffon ainsi que le pouvoir de repopulation de ces cellules.

Il serait également important d'investiguer l'origine du pouvoir d'expansion du PDFM. Le PDGF, un facteur de croissance contenu dans le PDFM est connu comme pouvant induire une expansion des progéniteurs mégakaryocytaires. Il

serait intéressant d'évaluer cette hypothèse, et de déterminer la contribution d'autres facteurs à l'activité du PDFM.

D'autre part, l'élimination du TGF- $\beta$  contenu dans le PDFM pourrait confirmer ou infirmer notre hypothèse stipulant que le TGF- $\beta$  contenu dans le PDFM est néfaste à l'expansion des progéniteurs mégakaryocytaires. Il serait aussi utile d'évaluer la capacité de PDFM obtenu de plaquettes humaines, plutôt que porcines, à exercer un effet d'expansion encore plus grand sur les progéniteurs hématopoïétiques humains. Ces travaux, jumelés à des expériences *in vivo*, pourraient aussi nous informer sur le pouvoir de maintien du TGF- $\beta$  sur les progéniteurs à long terme.

L'ensemble de nos travaux démontre donc un potentiel certain d'un dérivé de plaquettes matures pour l'expansion *ex vivo* et le maintien de progéniteurs hématopoïétiques murins et humains. Cette stratégie pourrait diminuer de façon significative la morbidité et la mortalité reliée à la greffe de cellules souches, entraînerait des coûts moins importants que lors de l'utilisation de cytokines recombinantes, et en offrant la possibilité que ce produit soit fabriqué de façon autologue, pourrait être réalisée dans un cadre sécuritaire.



## Reference List

- (1) Weisdorf DJ. Bone marrow transplantation. What you need to know. *Postgrad Med.* 1990;87:91-101.
- (2) Gratwohl A. Bone marrow transplantation today. *Support Care Cancer.* 1994;2:27-34.
- (3) van Bekkum DW. Experimental basis of hematopoietic stem cell transplantation for treatment of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 2002;72:609-620.
- (4) Fruchtman S. Stem cell transplantation. *Mt Sinai J Med.* 2003;70:166-170.
- (5) Saba N, Abraham R, Keating A. Overview of autologous stem cell transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000;36:27-48.
- (6) Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Hermans J. Blood and marrow transplantation activity in Europe 1997. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.* 1999;24:231-245.
- (7) Fauth F, Martin H, Sonnhoff S et al. Purging of G-CSF-mobilized peripheral autografts in acute leukemia with mafosfamide and amifostine to protect normal progenitor cells. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25:831-836.
- (8) Balzarotti M, Grisanti S, Granzow K et al. Ex vivo manipulation of hematopoietic stem cells for transplantation: the potential role of amifostine. *Semin Oncol.* 1999;26:66-71.
- (9) Guimond M, Balassy A, Barrette M et al. P-glycoprotein targeting: a unique strategy to selectively eliminate immunoreactive T cells. *Blood.* 2002;100:375-382.
- (10) Efremidis AP, Koumakis G, Filis J et al. Peripheral blood progenitor cell (PBPC) transplantation with a single apheresis in patients with lymphoma, myeloma and solid tumors. *Eur J Haematol.* 1996;57:269-277.
- (11) Mahe B, Milpied N, Hermouet S et al. G-CSF alone mobilizes sufficient peripheral blood CD34+ cells for positive selection in newly diagnosed patients with myeloma. *Br J Haematol.* 1996;92:263-268.
- (12) Siena S, Bregni M, Gianni AM. Mobilization of peripheral blood progenitor cells for autografting: chemotherapy and G-CSF or GM-CSF. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 1999;12:27-39.
- (13) Testoni N, Lemoli RM, Martinelli G et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation in acute myeloblastic leukaemia and myelodysplastic syndrome patients: evaluation of tumour cell

- contamination of leukaphereses by cytogenetic and molecular methods. *Bone Marrow Transplant*. 1998;22:1065-1070.
- (14) Demuynck H, Delforge M, Verhoef GE et al. Feasibility of peripheral blood progenitor cell harvest and transplantation in patients with poor-risk myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1996;92:351-359.
  - (15) Broxmeyer HE, Gluckman E, Auerbach A et al. Human umbilical cord blood: a clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Int J Cell Cloning*. 1990;8 Suppl 1:76-89.
  - (16) Christensen RD, Harper TE, Rothstein G. Granulocyte-macrophage progenitor cells in term and preterm neonates. *J Pediatr*. 1986;109:1047-1051.
  - (17) Haneline LS, Marshall KP, Clapp DW. The highest concentration of primitive hematopoietic progenitor cells in cord blood is found in extremely premature infants. *Pediatr Res*. 1996;39:820-825.
  - (18) Risdon G, Gaddy J, Stehman FB, Broxmeyer HE. Proliferative and cytotoxic responses of human cord blood T lymphocytes following allogeneic stimulation. *Cell Immunol*. 1994;154:14-24.
  - (19) Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100:157-168.
  - (20) Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996;273:242-245.
  - (21) Lemischka I. Stem cell dogmas in the genomics era. *Rev Clin Exp Hematol*. 2001;5:15-25.
  - (22) Eaves C, Miller C, Cashman J et al. Hematopoietic stem cells: inferences from in vivo assays. *Stem Cells*. 1997;15 Suppl 1:1-5.
  - (23) Holyoake TL, Nicolini FE, Eaves CJ. Functional differences between transplantable human hematopoietic stem cells from fetal liver, cord blood, and adult marrow. *Exp Hematol*. 1999;27:1418-1427.
  - (24) Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996;87:1-13.
  - (25) Healy L, May G, Gale K et al. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:12240-12244.
  - (26) Bonnet D. Haematopoietic stem cells. *J Pathol*. 2002;197:430-440.
  - (27) Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996;273:242-245.
  - (28) Morel F, Galy A, Chen B, Szilvassy SJ. Equal distribution of competitive long-term repopulating stem cells in the CD34+ and. *Exp Hematol*. 1998;26:440-448.

- (29) Donnelly DS, Zeltermann D, Sharkis S, Krause DS. Functional activity of murine CD34+ and. *Exp Hematol*. 1999;27:788-796.
- (30) Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. Human bone marrow. *Exp Hematol*. 1998;26:353-360.
- (31) Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med*. 1998;4:1038-1045.
- (32) Sato T, Laver JH, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood*. 1999;94:2548-2554.
- (33) Tajima F, Sato T, Laver JH, Ogawa M. CD34 expression by murine hematopoietic stem cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 2000;96:1989-1993.
- (34) Wuchter C, Ratei R, Spahn G et al. Impact of CD133 (AC133) and CD90 expression analysis for acute leukemia immunophenotyping. *Haematologica*. 2001;86:154-161.
- (35) Majka M, Ratajczak J, Machalinski B et al. Expression, regulation and function of AC133, a putative cell surface marker of primitive human haematopoietic cells. *Folia Histochem Cytobiol*. 2000;38:53-63.
- (36) Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*. 1996;183:1797-1806.
- (37) Yusa K, Tsuruo T. Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells. *Cancer Res*. 1989;49:5002-5006.
- (38) Miller CL, Eaves CJ. Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:13648-13653.
- (39) Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med*. 1997;3:1337-1345.
- (40) Uchida N, Fujisaki T, Eaves AC, Eaves CJ. Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD34(+) side population (SP)phenotype. *J Clin Invest*. 2001;108:1071-1077.
- (41) Pedersen NT. The pulmonary vessels as a filter for circulating megakaryocytes in rats. *Scand J Haematol*. 1974;13:225-231.
- (42) Mazur EM, Hoffman R, Chasis J, Marchesi S, Bruno E. Immunofluorescent identification of human megakaryocyte colonies using an antiplatelet glycoprotein antiserum. *Blood*. 1981;57:277-286.
- (43) Schipper LF, Brand A, Reniers N et al. Differential maturation of megakaryocyte progenitor cells from cord blood and mobilized peripheral blood. *Exp Hematol*. 2003;31:324-330.
- (44) Gewirtz AM. Megakaryocytopoiesis: the state of the art. *Thromb Haemost*. 1995;74:204-209.

- (45) Nevo S, Vogelsang GB. Acute bleeding complications in patients after bone marrow transplantation. *Curr Opin Hematol*. 2001;8:319-325.
- (46) Wolkers WF, Walker NJ, Tablin F, Crowe JH. Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. *Cryobiology*. 2001;42:79-87.
- (47) McCullough J. Current issues with platelet transfusion in patients with cancer. *Semin Hematol*. 2000;37:3-10.
- (48) McCullough J. Current issues with platelet transfusion in patients with cancer. *Semin Hematol*. 2000;37:3-10.
- (49) Ishibashi T, Kimura H, Uchida T et al. Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:5953-5957.
- (50) Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y et al. Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood*. 1989;74:1241-1244.
- (51) Gordon MS, McCaskill-Stevens WJ, Battiato LA et al. A phase I trial of recombinant human interleukin-11 (neumega rhIL-11 growth factor) in women with breast cancer receiving chemotherapy. *Blood*. 1996;87:3615-3624.
- (52) Gordon MS, Nemunaitis J, Hoffman R et al. A phase I trial of recombinant human interleukin-6 in patients with myelodysplastic syndromes and thrombocytopenia. *Blood*. 1995;85:3066-3076.
- (53) Nieken J, Mulder NH, Buter J et al. Recombinant human interleukin-6 induces a rapid and reversible anemia in cancer patients. *Blood*. 1995;86:900-905.
- (54) Maslak P, Nimer SD. The efficacy of IL-3, SCF, IL-6, and IL-11 in treating thrombocytopenia. *Semin Hematol*. 1998;35:253-260.
- (55) Du XX, Williams DA. Interleukin-11: a multifunctional growth factor derived from the hematopoietic microenvironment. *Blood*. 1994;83:2023-2030.
- (56) Du X, Everett ET, Wang G et al. Murine interleukin-11 (IL-11) is expressed at high levels in the hippocampus and expression is developmentally regulated in the testis. *J Cell Physiol*. 1996;168:362-372.
- (57) Nandurkar HH, Robb L, Tarlinton D et al. Adult mice with targeted mutation of the interleukin-11 receptor (IL11Ra) display normal hematopoiesis. *Blood*. 1997;90:2148-2159.
- (58) Nandurkar HH, Robb L, Begley CG. The role of IL-II in hematopoiesis as revealed by a targeted mutation of its receptor. *Stem Cells*. 1998;16 Suppl 2:53-65.
- (59) Yonemura Y, Kawakita M, Masuda T et al. Synergistic effects of interleukin 3 and interleukin 11 on murine megakaryopoiesis in serum-free culture. *Exp Hematol*. 1992;20:1011-1016.

- (60) Broudy VC, Lin NL, Kaushansky K. Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood*. 1995;85:1719-1726.
- (61) Bruno E, Briddell RA, Cooper RJ, Hoffman R. Effects of recombinant interleukin 11 on human megakaryocyte progenitor cells. *Exp Hematol*. 1991;19:378-381.
- (62) Teramura M, Kobayashi S, Hoshino S, Oshimi K, Mizoguchi H. Interleukin-11 enhances human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood*. 1992;79:327-331.
- (63) Navarro S, Debili N, Le Couedic JP et al. Interleukin-6 and its receptor are expressed by human megakaryocytes: in vitro effects on proliferation and endoreplication. *Blood*. 1991;77:461-471.
- (64) Kaushansky K, Broudy VC, Lin N et al. Thrombopoietin, the Mpl ligand, is essential for full megakaryocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:3234-3238.
- (65) Neben TY, Loebelenz J, Hayes L et al. Recombinant human interleukin-11 stimulates megakaryocytopoiesis and increases peripheral platelets in normal and splenectomized mice. *Blood*. 1993;81:901-908.
- (66) Hawley RG, Hawley TS, Fong AZ et al. Thrombopoietic potential and serial repopulating ability of murine hematopoietic stem cells constitutively expressing interleukin 11. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:10297-10302.
- (67) Tepler I, Elias L, Smith JW et al. A randomized placebo-controlled trial of recombinant human interleukin-11 in cancer patients with severe thrombocytopenia due to chemotherapy. *Blood*. 1996;87:3607-3614.
- (68) Debili N, Wendling F, Cosman D et al. The Mpl receptor is expressed in the megakaryocytic lineage from late progenitors to platelets. *Blood*. 1995;85:391-401.
- (69) Debili N, Wendling F, Katz A et al. The Mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors. *Blood*. 1995;86:2516-2525.
- (70) Choi ES, Hokom M, Bartley T et al. Recombinant human megakaryocyte growth and development factor (rHuMGDF), a ligand for c-Mpl, produces functional human platelets in vitro. *Stem Cells*. 1995;13:317-322.
- (71) Zucker-Franklin D, Kaushansky K. Effect of thrombopoietin on the development of megakaryocytes and platelets: an ultrastructural analysis. *Blood*. 1996;88:1632-1638.
- (72) Ito T, Ishida Y, Kashiwagi R, Kuriya S. Recombinant human c-Mpl ligand is not a direct stimulator of proplatelet formation in mature human megakaryocytes. *Br J Haematol*. 1996;94:387-390.
- (73) Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, Moore MW. Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science*. 1994;265:1445-1447.

- (74) de Sauvage FJ, Carver-Moore K, Luoh SM et al. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J Exp Med*. 1996;183:651-656.
- (75) Carver-Moore K, Broxmeyer HE, Luoh SM et al. Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin-and c-mpl-deficient mice. *Blood*. 1996;88:803-808.
- (76) Alexander WS, Roberts AW, Nicola NA, Li R, Metcalf D. Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood*. 1996;87:2162-2170.
- (77) Kaushansky K. Thrombopoietin and hematopoietic stem cell development. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;872:314-319.
- (78) Verfaillie CM. Optimizing hematopoietic stem cell engraftment: a novel role for thrombopoietin. *J Clin Invest*. 2002;110:303-304.
- (79) Kobayashi M, Laver JH, Kato T, Miyazaki H, Ogawa M. Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cells in synergy with steel factor and/or interleukin-3. *Blood*. 1996;88:429-436.
- (80) Ku H, Yonemura Y, Kaushansky K, Ogawa M. Thrombopoietin, the ligand for the Mpl receptor, synergizes with steel factor and other early acting cytokines in supporting proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice. *Blood*. 1996;87:4544-4551.
- (81) Ohmizono Y, Sakabe H, Kimura T et al. Thrombopoietin augments ex vivo expansion of human cord blood-derived hematopoietic progenitors in combination with stem cell factor and flt3 ligand. *Leukemia*. 1997;11:524-530.
- (82) Piacibello W, Sanavio F, Garetto L et al. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood*. 1997;89:2644-2653.
- (83) Borge OJ, Ramsfjell V, Cui L, Jacobsen SE. Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34+. *Blood*. 1997;90:2282-2292.
- (84) Kaushansky K, Lok S, Holly RD et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature*. 1994;369:568-571.
- (85) Harker LA, Marzec UM, Hunt P et al. Dose-response effects of pegylated human megakaryocyte growth and development factor on platelet production and function in nonhuman primates. *Blood*. 1996;88:511-521.
- (86) Ulich TR, del Castillo J, Yin S et al. Megakaryocyte growth and development factor ameliorates carboplatin-induced thrombocytopenia in mice. *Blood*. 1995;86:971-976.

- (87) Thomas GR, Thibodeaux H, Errett CJ et al. In vivo biological effects of various forms of thrombopoietin in a murine model of transient pancytopenia. *Stem Cells*. 1996;14 Suppl 1:246-255.
- (88) Hokom MM, Lacey D, Kinstler OB et al. Pegylated megakaryocyte growth and development factor abrogates the lethal thrombocytopenia associated with carboplatin and irradiation in mice. *Blood*. 1995;86:4486-4492.
- (89) Miyazaki H. Update on thrombopoietin in preclinical and clinical trials. *Curr Opin Hematol*. 1998;5:197-202.
- (90) Begley CG. Clinical studies with megakaryocyte growth and development factor (Mpl-ligand). *Thromb Haemost*. 1997;78:42-46.
- (91) Bassier RL, Rasko JE, Clarke K et al. Thrombopoietic effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHuMGDF) in patients with advanced cancer. *Lancet*. 1996;348:1279-1281.
- (92) O'Malley CJ, Rasko JE, Bassier RL et al. Administration of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor to humans stimulates the production of functional platelets that show no evidence of in vivo activation. *Blood*. 1996;88:3288-3298.
- (93) Bassier RL, Rasko JE, Clarke K et al. Randomized, blinded, placebo-controlled phase I trial of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor with filgrastim after dose-intensive chemotherapy in patients with advanced cancer. *Blood*. 1997;89:3118-3128.
- (94) Bassier RL, O'Flaherty E, Green M et al. Development of pancytopenia with neutralizing antibodies to thrombopoietin after multicycle chemotherapy supported by megakaryocyte growth and development factor. *Blood*. 2002;99:2599-2602.
- (95) Li J, Yang C, Xia Y et al. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood*. 2001;98:3241-3248.
- (96) Demetri GD. Pharmacologic treatment options in patients with thrombocytopenia. *Semin Hematol*. 2000;37:11-18.
- (97) Vadhan-Raj S, Murray LJ, Bueso-Ramos C et al. Stimulation of megakaryocyte and platelet production by a single dose of recombinant human thrombopoietin in patients with cancer. *Ann Intern Med*. 1997;126:673-681.
- (98) Vadhan-Raj S. Recombinant human thrombopoietin: clinical experience and in vivo biology. *Semin Hematol*. 1998;35:261-268.
- (99) Maslak P, Nimer SD. The efficacy of IL-3, SCF, IL-6, and IL-11 in treating thrombocytopenia. *Semin Hematol*. 1998;35:253-260.
- (100) McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM. Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Exp Hematol*. 1991;19:226-231.

- (101) Neben S, Donaldson D, Sieff C et al. Synergistic effects of interleukin-11 with other growth factors on the expansion of murine hematopoietic progenitors and maintenance of stem cells in liquid culture. *Exp Hematol.* 1994;22:353-359.
- (102) van d, V, Ishizawa L, Law P, Cairo MS. IL-11 in combination with SLF and G-CSF or GM-CSF significantly increases expansion of isolated CD34+ cell population from cord blood vs. adult bone marrow. *Exp Hematol.* 1995;23:1289-1295.
- (103) Williams N, Bertoncello I, Kavnoudias H, Zsebo K, McNiece I. Recombinant rat stem cell factor stimulates the amplification and differentiation of fractionated mouse stem cell populations. *Blood.* 1992;79:58-64.
- (104) Bernstein ID, Andrews RG, Zsebo KM. Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by CD34+ and CD34+lin- cells, and the generation of colony-forming cell progeny from CD34+lin- cells cultured with interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 1991;77:2316-2321.
- (105) Leary AG, Zeng HQ, Clark SC, Ogawa M. Growth factor requirements for survival in G0 and entry into the cell cycle of primitive human hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:4013-4017.
- (106) Li CL, Johnson GR. Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. *Blood.* 1994;84:408-414.
- (107) Peters SO, Kittler EL, Ramshaw HS, Quesenberry PJ. Ex vivo expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood.* 1996;87:30-37.
- (108) Yonemura Y, Ku H, Hirayama F, Souza LM, Ogawa M. Interleukin 3 or interleukin 1 abrogates the reconstituting ability of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:4040-4044.
- (109) Yan XQ, Briddell R, Hartley C et al. Mobilization of long-term hematopoietic reconstituting cells in mice by the combination of stem cell factor plus granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 1994;84:795-799.
- (110) Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, Ikuta K, Weissman IL. Steel factor influences the distribution and activity of murine hematopoietic stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:3760-3764.
- (111) Bodine DM, Seidel NE, Orlic D. Bone marrow collected 14 days after in vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor to mice has 10-fold more repopulating ability than untreated bone marrow. *Blood.* 1996;88:89-97.



- (125) Nichol JL, Hornkohl AC, Choi ES et al. Enrichment and characterization of peripheral blood-derived megakaryocyte progenitors that mature in short-term liquid culture. *Stem Cells*. 1994;12:494-505.
- (126) Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl A et al. Megakaryocyte growth and development factor. Analyses of in vitro effects on human megakaryopoiesis and endogenous serum levels during chemotherapy-induced thrombocytopenia. *J Clin Invest*. 1995;95:2973-2978.
- (127) Tao H, Gaudry L, Rice A, Chong B. Cord blood is better than bone marrow for generating megakaryocytic progenitor cells. *Exp Hematol*. 1999;27:293-301.
- (128) Mayani H, Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells*. 1998;16:153-165.
- (129) Lefebvre P, Winter JN, Kahn LE, Giri JG, Cohen I. Megakaryocyte ex vivo expansion potential of three hematopoietic sources in serum and serum-free medium. *J Hematother*. 1999;8:199-208.
- (130) Gehling UM, Ryder JW, Hogan CJ et al. Ex vivo expansion of megakaryocyte progenitors: effect of various growth factor combinations on CD34+ progenitor cells from bone marrow and G-CSF-mobilized peripheral blood. *Exp Hematol*. 1997;25:1125-1139.
- (131) Laluppa JA, Papoutsakis ET, Miller WM. Evaluation of cytokines for expansion of the megakaryocyte and granulocyte lineages. *Stem Cells*. 1997;15:198-206.
- (132) Williams JL, Pipia GG, Datta NS, Long MW. Thrombopoietin requires additional megakaryocyte-active cytokines for optimal ex vivo expansion of megakaryocyte precursor cells. *Blood*. 1998;91:4118-4126.
- (133) Ratajczak MZ, Ratajczak J, Machalinski B, Mick R, Gewirtz AM. In vitro and in vivo evidence that ex vivo cytokine priming of donor marrow cells may ameliorate posttransplant thrombocytopenia. *Blood*. 1998;91:353-359.
- (134) Sui X, Tsuji K, Ebihara Y et al. Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor with IL-6 stimulates megakaryopoiesis from human CD34(+) cells through glycoprotein (gp)130 signaling. *Blood*. 1999;93:2525-2532.
- (135) Lefebvre P, Winter JN, Meng Y, Cohen I. Ex vivo expansion of early and late megakaryocyte progenitors. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000;9:913-921.
- (136) Bertolini F, Battaglia M, Pedrazzoli P et al. Megakaryocytic progenitors can be generated ex vivo and safely administered to autologous peripheral blood progenitor cell transplant recipients. *Blood*. 1997;89:2679-2688.
- (137) Paquette RL, Dergham ST, Karpf E et al. Culture conditions affect the ability of ex vivo expanded peripheral blood progenitor cells to accelerate hematopoietic recovery. *Exp Hematol*. 2002;30:374-380.

- (138) Shpall EJ, Quinones R, Giller R et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8:368-376.
- (139) Beauger N. Manipulation *ex vivo* de greffons pour éliminer les cellules malignes et favoriser l'expansion des cellules souches hématopoïétiques normales. Université de Montréal, 2001.
- (140) Beauger N. Manipulation *ex vivo* de greffons pour éliminer les cellules malignes et favoriser l'expansion des cellules souches hématopoïétiques normales. Université de Montréal, 2001.
- (141) Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol*. 2001;2:172-180.
- (142) Murdoch B, Chadwick K, Martin M et al. Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:3422-3427.
- (143) Reya T, Duncan AW, Ailles L et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003;423:409-414.
- (144) Varas F, Bernard A, Bueren JA. Restrictions in the stem cell function of murine bone marrow grafts after ex vivo expansion of short-term repopulating progenitors. *Exp Hematol*. 1998;26:100-109.
- (145) McNiece IK, Almeida-Porada G, Shpall EJ, Zanjani E. Ex vivo expanded cord blood cells provide rapid engraftment in fetal sheep but lack long-term engrafting potential. *Exp Hematol*. 2002;30:612-616.
- (146) Peters SO, Kittler EL, Ramshaw HS, Quesenberry PJ. Ex vivo expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood*. 1996;87:30-37.
- (147) Sungaran R, Chisholm OT, Markovic B et al. The role of platelet alpha-granular proteins in the regulation of thrombopoietin messenger RNA expression in human bone marrow stromal cells. *Blood*. 2000;95:3094-3101.
- (148) Vassbotn FS, Havnen OK, Heldin CH, Holmsen H. Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor. *J Biol Chem*. 1994;269:13874-13879.
- (149) Sungaran R, Chisholm OT, Markovic B et al. The role of platelet alpha-granular proteins in the regulation of thrombopoietin messenger RNA

- (112) Andrews RG, Bensinger WI, Knitter GH et al. The ligand for c-kit, stem cell factor, stimulates the circulation of cells that engraft lethally irradiated baboons. *Blood*. 1992;80:2715-2720.
- (113) Briddell RA, Hartley CA, Smith KA, McNiece IK. Recombinant rat stem cell factor synergizes with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in vivo in mice to mobilize peripheral blood progenitor cells that have enhanced repopulating potential. *Blood*. 1993;82:1720-1723.
- (114) Hunt P, Zsebo KM, Hokom MM et al. Evidence that stem cell factor is involved in the rebound thrombocytosis that follows 5-fluorouracil treatment. *Blood*. 1992;80:904-911.
- (115) Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1966;44:287-299.
- (116) McNiece I, Briddell R. Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells and mature cells. *Exp Hematol*. 2001;29:3-11.
- (117) Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Exp Hematol*. 2001;29:1125-1134.
- (118) Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell*. 2002;109:39-45.
- (119) Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev*. 1995;9:1753-1765.
- (120) Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK. Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. *Blood*. 1999;94:2605-2612.
- (121) Buske C, Feuring-Buske M, Abramovich C et al. Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood*. 2002;100:862-868.
- (122) Murdoch B, Chadwick K, Martin M et al. Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:3422-3427.
- (123) Reya T, Duncan AW, Ailles L et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003;423:409-414.
- (124) Kros J, Beslu N, Mayotte N, Humphries RK, Sauvageau G. The competitive nature of HOXB4-transduced HSC is limited by PBX1: the generation of ultra-competitive stem cells retaining full differentiation potential. *Immunity*. 2003;18:561-571.

expression in human bone marrow stromal cells. *Blood*. 2000;95:3094-3101.

- (150) Vassbotn FS, Havnen OK, Heldin CH, Holmsen H. Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor. *J Biol Chem*. 1994;269:13874-13879.
- (151) Yang M, Chesterman CN, Chong BH. Recombinant PDGF enhances megakaryocytopoiesis in vitro. *Br J Haematol*. 1995;91:285-289.
- (152) Yang M, Khachigian LM, Hicks C, Chesterman CN, Chong BH. Identification of PDGF receptors on human megakaryocytes and megakaryocytic cell lines. *Thromb Haemost*. 1997;78:892-896.
- (153) Berthier R, Valiron O, Schweitzer A, Marguerie G. Serum-free medium allows the optimal growth of human megakaryocyte progenitors compared with human plasma supplemented cultures: role of TGF beta. *Stem Cells*. 1993;11:120-129.
- (154) Berthier R, Valiron O, Schweitzer A, Marguerie G. Serum-free medium allows the optimal growth of human megakaryocyte progenitors compared with human plasma supplemented cultures: role of TGF beta. *Stem Cells*. 1993;11:120-129.
- (155) Lefebvre P, Winter JN, Kahn LE, Giri JG, Cohen I. Megakaryocyte ex vivo expansion potential of three hematopoietic sources in serum and serum-free medium. *J Hematother*. 1999;8:199-208.
- (156) Berthier R, Valiron O, Schweitzer A, Marguerie G. Serum-free medium allows the optimal growth of human megakaryocyte progenitors compared with human plasma supplemented cultures: role of TGF beta. *Stem Cells*. 1993;11:120-129.
- (157) Beauger N. Manipulation *ex vivo* de greffons pour éliminer les cellules malignes et favoriser l'expansion des cellules souches hématopoïétiques normales. Université de Montréal, 2001.
- (158) Sporn MB, Roberts AB. Introduction: what is TGF-beta? *Ciba Found Symp*. 1991;157:1-6.
- (159) Jackson H, Williams N, Westcott KR, Green R. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on distinct developmental stages of murine megakaryocytopoiesis. *J Cell Physiol*. 1994;161:312-318.
- (160) Berthier R, Valiron O, Schweitzer A, Marguerie G. Serum-free medium allows the optimal growth of human megakaryocyte progenitors

compared with human plasma supplemented cultures: role of TGF beta. *Stem Cells*. 1993;11:120-129.

- (161) Kuter DJ, Gminski DM, Rosenberg RD. Transforming growth factor beta inhibits megakaryocyte growth and endomitosis. *Blood*. 1992;79:619-626.
- (162) Greenberg SM, Chandrasekhar C, Golan DE, Handin RI. Transforming growth factor beta inhibits endomitosis in the Dami human megakaryocytic cell line. *Blood*. 1990;76:533-537.
- (163) Zauli G, Visani G, Catani L et al. Reduced responsiveness of bone marrow megakaryocyte progenitors to platelet-derived transforming growth factor beta 1, produced in normal amount, in patients with essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*. 1993;83:14-20.
- (164) Yang M, Chesterman CN, Chong BH. Recombinant PDGF enhances megakaryocytopoiesis in vitro. *Br J Haematol*. 1995;91:285-289.
- (165) Su RJ, Li K., Yang M., C.M.Y. Chiu, and P.M.P Yuen. Effects of platelet derived growth factor on the ex vivo expansion of cord blood CD34+ cells [abstract]. *Exp Hematol*. 2000;28:1491-1505.
- (166) Michalewicz R, Katz F, Stroobant P et al. Platelet-derived growth factor stimulates growth of highly enriched multipotent haemopoietic progenitors. *Br J Haematol*. 1986;63:591-598.
- (167) Dainiak N, Davies G, Kalmanti M, Lawler J, Kulkarni V. Platelet-derived growth factor promotes proliferation of erythropoietic progenitor cells in vitro. *J Clin Invest*. 1983;71:1206-1214.
- (168) Sakamaki S, Hirayama Y, Matsunaga T et al. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) induces thrombopoietin from bone marrow stromal cells, which stimulates the expression of TGF-beta receptor on megakaryocytes and, in turn, renders them susceptible to suppression by TGF-beta itself with high specificity. *Blood*. 1999;94:1961-1970.
- (169) Sakamaki S, Hirayama Y, Matsunaga T et al. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) induces thrombopoietin from bone marrow stromal cells, which stimulates the expression of TGF-beta receptor on megakaryocytes and, in turn, renders them susceptible to suppression by TGF-beta itself with high specificity. *Blood*. 1999;94:1961-1970.
- (170) Szilvassy SJ, Weller KP, Chen B et al. Partially differentiated ex vivo expanded cells accelerate hematologic recovery in myeloablated mice transplanted with highly enriched long-term repopulating stem cells. *Blood*. 1996;88:3642-3653.

- (171) Sitnicka E, Ruscetti FW, Priestley GV, Wolf NS, Bartelmez SH.  
Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the  
initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells.  
Blood. 1996;88:82-88.

## **ANNEXE**

## Annexe 1

